

Chapitre n°9 : Microbiologie médicale

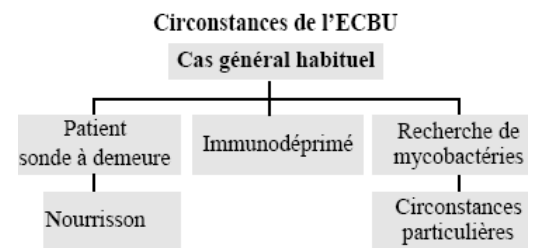
1. Infections du tractus urinaire (ITU)

1.1. Signes cliniques

Circonstances amenant à demander un ECBU

Symptomatologie urinaire : présente	Symptomatologie urinaire : absente
Patente <ul style="list-style-type: none">• Dysurie• Pollakiurie• Pesanteur vésicale• Hématurie macroscopique	Trompeuse <ul style="list-style-type: none">• Protéinurie• Hyperthermie isolée• Personne âgée• Diabétique
Evocatrice <ul style="list-style-type: none">• Incontinence urinaire• Douleurs lombaires• Hyperthermie associée à un autre signe• Leucocyturie et/ou NO₃ réductase (bandelette)	Systématique <ul style="list-style-type: none">• Femme enceinte• Pré-opératoire urologique ou gynécologique• Contrôle post-thérapeutique

La **dysurie** est l'émission difficile et douloureuse d'urine. La **pollakiurie** est une miction excessive en petites quantités.



1.2. Prélèvement

TECHNIQUE DE L'ECBU

- Sur les urines du matin (ou sur des urines ayant stagné 4 heures dans la vessie).
 - **Après une toilette** avec une solution antiseptique (exemple: Dakin):
 - . chez l'homme : du méat après décalottage;
 - . chez la femme : de la vulve et du méat en écartant les petites lèvres.
- Le sondage vésical doit être évité pour prélever un ECBU : il est source d'infection et de traumatisme urétral (mais il peut être nécessaire lorsqu'il est impossible d'obtenir un échantillon valable).
- En prélevant les **urines du milieu du jet** dans un flacon stérile.
 - L'ECBU doit être réalisé au mieux **au laboratoire**, pour éviter un délai trop long entre le prélèvement et l'examen ou un prélèvement incorrect (surtout chez la femme où il est parfois difficile d'obtenir sans aide un échantillon satisfaisant).

Chez l'homme les urines du premier jet peuvent être prélevées pour isoler le germe responsable d'une urétrite. Chez la femme la présence de germes dans l'urètre est physiologique.

Remarque : En attendant d'être analysé, le prélèvement doit être conservé à 4 °C au réfrigérateur (après 4 heures de stagnation les cellules commencent à s'altérer, par contre la bactériurie reste constante).

Cas particuliers :

- Chez l'enfant et le nourrisson : recueil par une poche stérile.
- Chez le sujet porteur d'une sonde **vésicale** : on peut, soit piquer à travers la tubulure après désinfection locale, soit recueillir les urines après avoir changé la sonde (certaines bactéries se développent davantage sur les parois des sondes que dans les urines).
- Chez les patients porteurs d'une dérivation cutanée des voies urinaires type Bricker : il est préférable de recueillir l'urine par introduction d'une sonde dans la stomie.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

VOIES PRINCIPALES DE PÉNÉTRATION URINAIRE DES BACTÉRIES

- La voie ascendante est la plus fréquente :
 - Elle peut être spontanée :
 - À partir du méat (physiologiquement porteur de Staphylocoques et de Streptocoques, mais pas de bacilles gram -) les germes peuvent remonter vers la vessie. Chez la femme, la brièveté de l'urètre, la proximité de l'anus et la tendance des bactéries du rectum (bacilles gram -) à coloniser le périnée, prédisposent à cette migration. Les rapports sexuels et les grossesses favorisent également cette ascension. La miction ayant un rôle de « chasse » des germes remontant vers la vessie, toute perturbation de celle-ci favorisera aussi cette ascension. Chez l'homme, l'urètre situé à distance de l'anus et les sécrétions prostatiques antibactériennes (riches en zinc) rendent cette migration peu fréquente.
 - Au cours des infections urinaires basses, l'inflammation du trigone perturbe la continence des orifices urétéraux. Les urines contaminées peuvent alors remonter vers le haut appareil urinaire.
 - Elle peut être provoquée (l'infection nosocomiale) :
 - Exemple : manœuvres endoscopiques, sondage urinaire.
- La voie hématogène :

Moins fréquente, elle survient lors d'une septicémie ou lors d'une bactériémie, surtout chez l'immunodéprimé et le diabétique. La porte d'entrée infectieuse, inconstamment retrouvée peut être variable : cutanée, O.R.L., dentaire...
- Extension directe à partir d'un organe de voisinage (voie lymphatique) :

Exemple : maladie inflammatoire de l'intestin, suppuration pelvienne aiguë chez la femme, abcès paravésical...

Invasion du parenchyme

Polysaccharides (*E.coli*)
Lésions causées par
Ischémie
Lysozyme
Radicaux libres
Hémolysine (*E. coli*)

Rein

Colonisation par voie
ascendante des reins

Facilité par
Adhésines [P-pili (*E. coli*)]
Obstruction
Maladies neurologiques
Grossesse
Reflux

Uretères

Vessie

Femme

Vessie

Colonisation par voie
ascendante de la vessie

Favorisée par
Adhésines [P-pili (*E. coli*)]
longueur de l'urètre
Rapports sexuels

Urètre

Anus

Homme

Prostate

Obstruction entraîne
un résidu urinaire

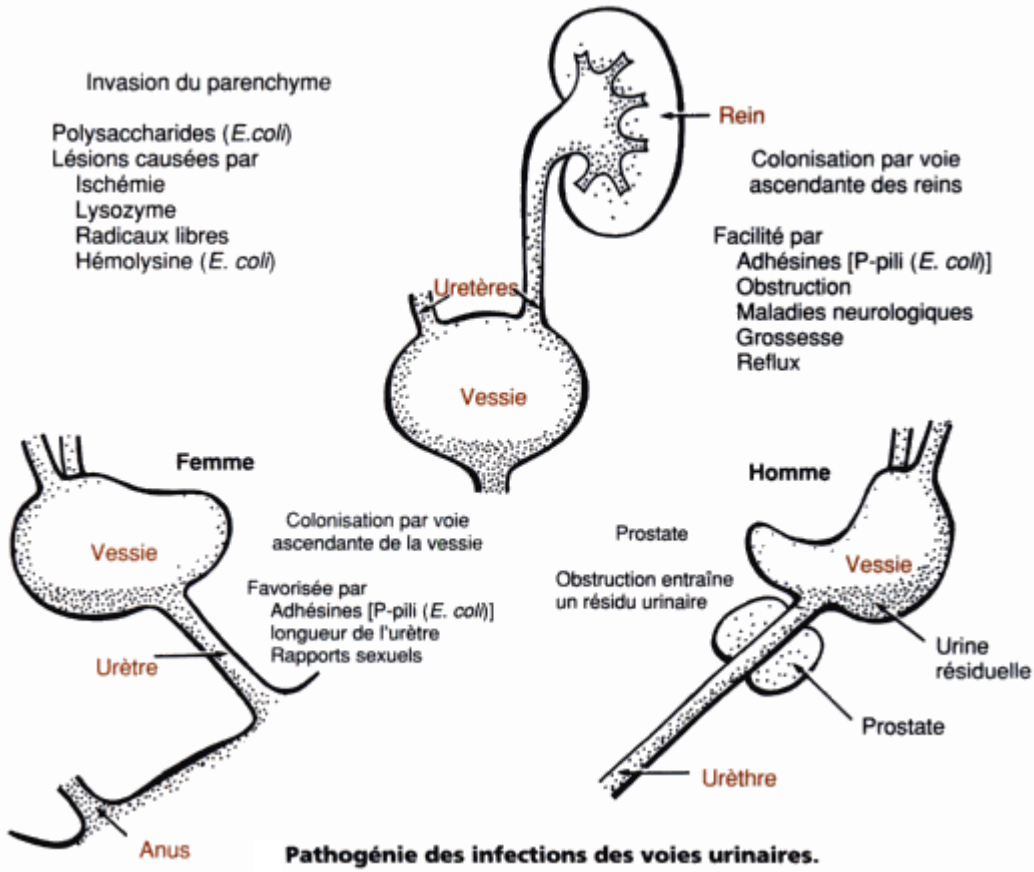
Vessie

Urine
résiduelle

Prostate

Urèthre

Pathogénie des infections des voies urinaires.



1.3. Diagnostic

Couleur et aspect des urines

Des urines troubles, persistant après adjonction de quelques gouttes d'acide type acide acétique, témoignent d'une pyurie (l'acide élimine un aspect trouble dû à une grande quantité de phosphates).

L'examen à la bandelette donne des résultats immédiats (il sera effectué sur une urine qui a séjourné au moins 4 heures dans la vessie):

BANDELETTE URINAIRE

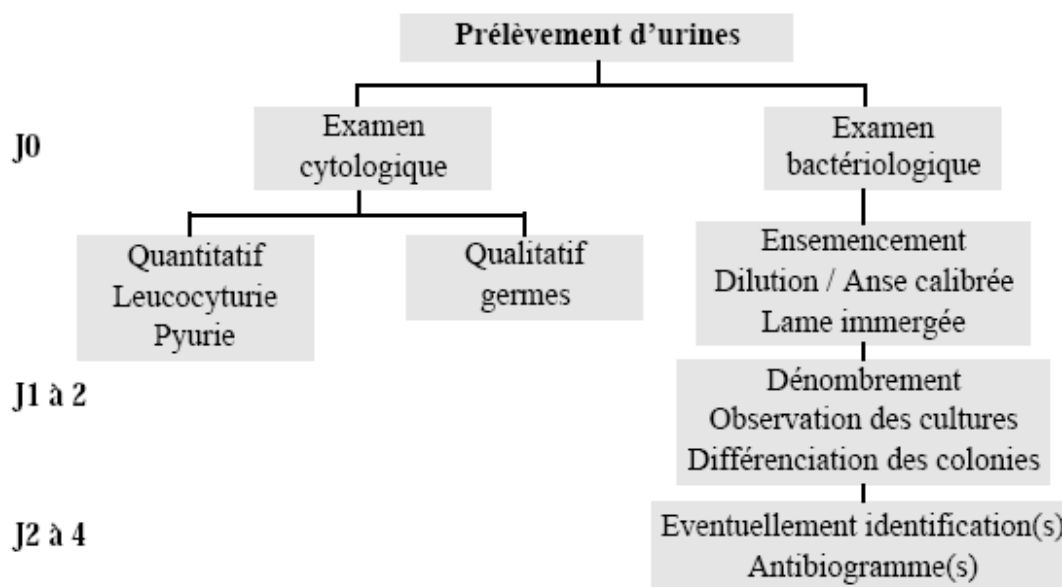
Elle recherche:

- une activité estérasique, témoin d'une leucocyturie > 10/mm³ (ou > 10⁶/ml);
- la présence de nitrites, témoin d'une bactériurie > 10⁶/ml.

Ce dernier test détecte uniquement les bactéries transformant les nitrates en nitrites: il sera donc négatif en cas d'infection à Streptocoque, Staphylocoque ou Pyocyanique; ce test sera également négatif si le pH urinaire est inférieur à 6 (il faudra donc toujours connaître le pH pour interpréter correctement un examen à la bandelette).

- L'absence de nitrite et d'activité estérasique permet d'éliminer une infection urinaire avec un taux de faux négatifs négligeable (1 à 2,5 %).
- La présence de nitrites ou d'activité estérasique oriente vers le diagnostic d'infection urinaire avec cependant un taux de faux positifs élevé (30 à 40 %).

Démarche :



A l'état physiologique, l'urine contient moins de 10 000 leucocytes et 5 000 hématies par ml. En cas d'infection urinaire, le processus inflammatoire se traduit le plus souvent par la présence de :

- > 50 000 leucocytes /ml, parfois en amas ;
- > 10 000 hématies /ml témoins de microhémorragies ;
- cellules du revêtement urothélial.

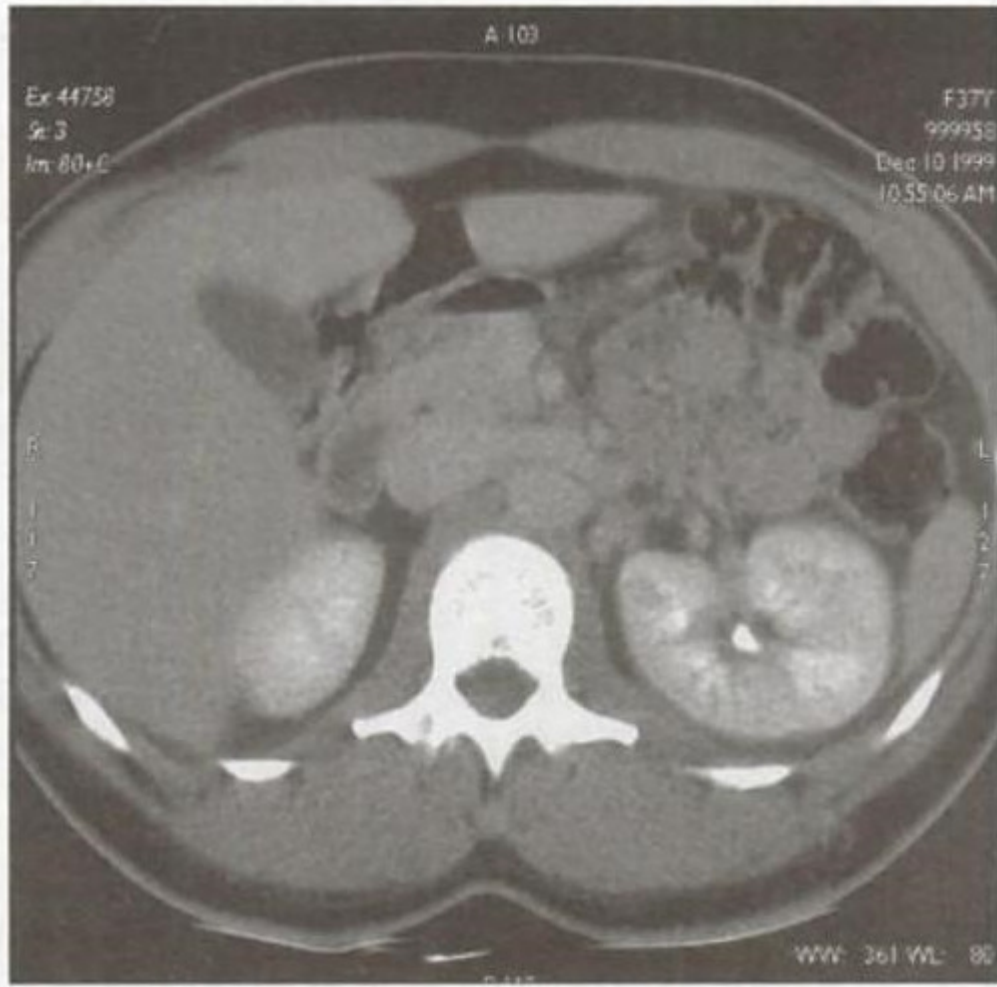
L'examen du frottis réalisé à partir du culot de centrifugation et coloré au Gram permet d'observer les éventuels micro-organismes présents et oriente le choix des milieux de culture. La présence de cellules épithéliales d'origine vaginale signe une contamination et entraîne le rejet de l'examen.

Le milieu de type C.L.E.D. se prête bien à la culture des urines. Certains milieux incorporant des chromogènes directs (CPS ID 3, URISELECT 4) peuvent s'avérer utiles au repérage des colonies. Selon les résultats de l'observation microscopique, on ensemence une gélose au sang voire une gélose chocolat sous 10% de CO₂.

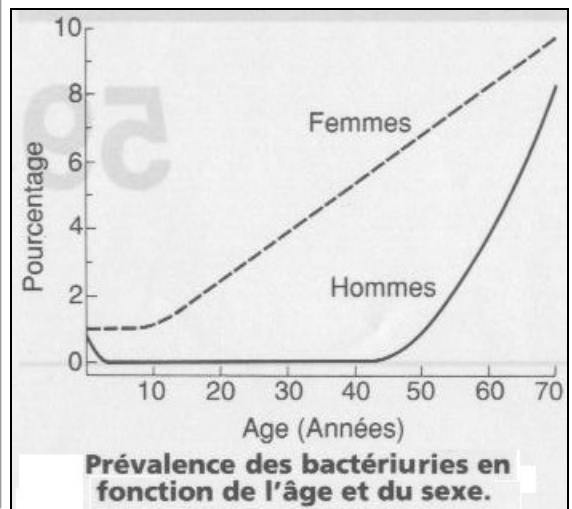
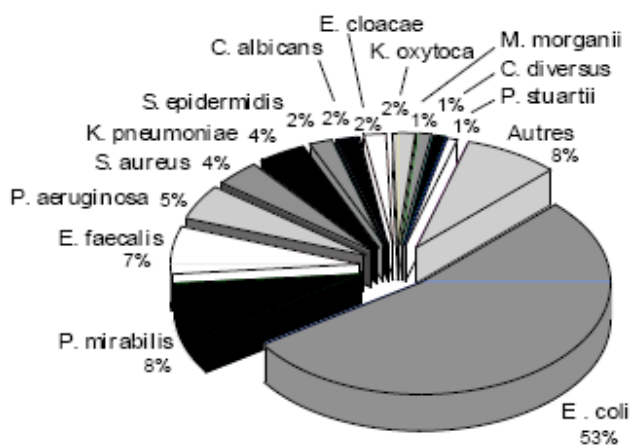
L'interprétation des cultures s'effectue de la manière suivante :

- Bactériurie < 10³ CFU / ml : absence d'infection
- Entre 10³ et 10⁴ CFU / ml : zone d'incertitude
- Bactériurie > 10⁵ CFU / ml : infection probable (valeurs à contrôler si besoin)

Image de pyélonéphrite gauche



Connaître les principales espèces microbiennes responsables d'ITU : fréquence des espèces à partir de 20 000 souches consécutives sur 4 ans en milieu hospitalier



1.4. Traitement et prévention

La réalisation de l'antibiogramme dans le cadre de l'ITU ne diffère pas techniquement des méthodes traditionnelles de mesure *in vitro* de sensibilité aux antibiotiques qu'elles soient manuelles ou automatisées. Le choix des molécules à tester résulte d'un compromis entre le spectre attendu de sensibilité de la bactérie incriminée et la diffusion de l'antibiotique au site de l'infection.

Type de l'infection	Durée du traitement	Antibiothérapie de première intention
Cystite simple de la femme	Dose unique	- PEFLACINE®, BACTRIM®, MONURIL® UNIFLOX®...
	3 à 5 jours	- Tout antibiotique urinaire par voie orale
Cystite compliquée	10 jours à 1 mois	- Fluoroquinolone en monothérapie
Pyélonéphrite aiguë simple	15 jours	- En l'absence de signe de gravité (terrain fragile, AEG infection nosocomiale...) et de vomissement: . Fluoroquinolone en monothérapie par voie orale
Pyélonéphrite sur obstacle	3 semaines	- Sinon . Bêta-lactamine + aminoside . Fluoroquinolone + aminoside . Fluoroquinolone + C3 G
Prostatite aiguë	1 mois	par voie parentérale avec relais par voie orale en monothérapie après 48 h d'apyrexie
Épididymite	1 mois	Cyclines (VIBRAMYCINE®) ou OFLOCET®
NB: Épididymite ou prostatite aiguë, avec suspicion d'infection par Chlamydiae Trachomatis ou Mycoplasme (sujet jeune)	3 semaines	
Prostatite chronique	2 à 3 mois	Fluoroquinolone ou BACTRIM® par voie orale
Pyélonéphrite chronique	1 mois	Fluoroquinolone par voie orale
PNA nosocomiale	3 s (1 s parentérale)	Fortum (3 g/j) + AMIKLIN® (15 mg/kg/j)
Cystite de la femme enceinte	7 jours	Bêta-lactamine

MESURES D'HYGIÈNE À RECOMMANDER EN CAS DE CYSTITES

- Boire au minimum 1,5 litre d'eau par jour répartis sur le nyctémère.
- Mictions régulières, complètes et pas trop espacées.
- Miction post-coïtale.
- Traitement d'une éventuelle infection génitale associée.
- Hygiène périnéale correcte mais sans excès.
- S'essuyer d'avant en arrière (et non l'inverse) après être allé aux toilettes.
- Régulariser le transit intestinal: régime alimentaire, au besoin laxatifs légers ou ralentisseurs du transit.
- Éviter le port de pantalons serrés et de sous-vêtements en fibres synthétiques.

Bibliographie :

Microbiologie et pathologie infectieuse ; Moselio Schaechter, Gerald Medoff, Barry I. Eisenstein ; De Boeck Université.

Urologie ; Éric Chartier ; Estem.

REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr) ;

<http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic.htm>

Les voies urinaires sont ouvertes sur l'extérieur, et sont donc logiquement souvent colonisées par les germes de la flore fécale. Les organismes responsables d'infections sont ceux qui sont capables d'adhérer sur les cellules épithéliales, sans être chassé par le flux urinaire.

Les mécanismes de défense de ce système sont différents des mécanismes habituellement mis en place dans l'organisme. Dans les voies urinaires, les leucocytes et la production d'anticorps n'occupent pas la place centrale. Les défenses sont assurées par des facteurs mécaniques, principalement le flux urinaire normal. En conséquence, une atteinte de ce système de défense, une obstruction, aboutit à une infection. Une donnée importante de ces infections, est la tendance à la rechute jusqu'à ce que le facteur prédisposant soit corrigé. Une approche thérapeutique et préventive optimale doit tenir compte de l'ensemble de ces facteurs.

Le plus grand défi du traitement des infections urinaires n'est pas la prise en charge de l'infection initiale mais le problème des récurrences. On a montré l'importance de faire la distinction entre rechute et réinfection, car ces deux types de récurrences doivent être traitées différemment.

Chez les patients qui font fréquemment des réinfections, le but principal doit être d'interrompre le cycle de colonisation du méat urétral et l'infection de la vessie. Les bons succès sont obtenus avec les traitements comme triméthoprime-sulfaméthoxazole, ou certaines quinolones qui atteignent des concentrations importantes dans les voies urinaires mais aussi dans les sécrétions vaginales. La recherche d'une malformation anatomique par radiographie ou échographie n'est pas nécessaire car la chance de retrouver cette anomalie est très faible. Cette recherche n'a d'indication que chez le jeune enfant ou chez les sujets dont les récurrences sont particulièrement fréquentes.

Les rechutes traduisent à l'inverse une anomalie structurale (calcul, obstruction, trouble de la fonction vésicale), ou une atteinte des tissus profonds (pyélonéphrite, abcès rénal, prostatite) et nécessite non seulement un traitement antibiotique prolongé mais des explorations urologiques (urographie intraveineuse).

Les infections des voies urinaires contractées au cours d'une hospitalisation sont en général résistantes aux antibiotiques par voie orale et nécessitent un traitement par β -lactamine à large spectre ou aminoside. Le traitement antibiotique préventif au cours des manœuvres instrumentales n'est pas recommandé, il ne fait que décaler de quelques jours l'infection et risque de sélectionner un germe résistant. On débute un traitement seulement en cas d'apparition de fièvre. Chez ce type de patient, le traitement permet de contrôler l'infection, mais sans l'éradiquer. L'éradication passe par le retrait du corps étranger (la sonde urinaire).

2. Infections du tube digestif

2.1. Signes cliniques

Le malade atteint de diarrhée émet des selles liquides ou molles (non moulées), glaireuses ou hémorragiques. La diarrhée peut être aiguë ou chronique, fébrile ou non. Tous les épisodes diarrhéiques ne sont pas infectieux. Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes. Parasites, virus et accessoirement levures y jouent un rôle important. La **coproculture** se pratique sur selles liquides, molles, glaireuses ou hémorragiques ou sur indications très précises pour des selles solides.

2.2. Prélèvement

Les selles sont recueillies dès émission dans un récipient propre. Une aliquote du volume d'une noix au minimum est prélevée à l'aide d'une spatule ou d'un flacon cuillère puis transférée dans un conteneur hermétique type «pot à vis stérile». Un échantillon muco-purulent ou sanglant est choisi lorsqu'il en existe. Un écouvillonnage rectal peut se révéler utile notamment chez le nourrisson et le petit enfant.

Les biopsies de muqueuses rectales ou coliques faites sous endoscopie sont analysées comme des matières fécales à l'exception de demande de recherche spécifique de mycobactérie. Le prélèvement doit être immédiatement acheminé au laboratoire ou conservé au maximum une nuit à + 4°C afin d'éviter la dessiccation et la prolifération des bactéries et levures commensales. Au delà de ce délai on utilise un milieu de transport (glycérine tamponnée).

2.3. Diagnostic

Al'état frais ou après coloration, dans le cas de selles liquides, cet examen est important pour orienter les cultures :

- **en cas de diarrhée à germes invasifs (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*) : il y a présence de leucocytes**, cependant, dans certaines diarrhées à bactéries invasives, la présence de leucocytes n'est pas toujours constante ;
- **en cas de diarrhée à germes entérotoxigéniques : il n'y a pas de leucocytes (*Vibrio cholerae*, *E. coli* entérotoxigènes ou ETEC, *Clostridium difficile*).**

Après coloration l'examen du frottis permet d'apprécier le pourcentage des deux types tinctoriaux bactériens. Une flore équilibrée est composée majoritairement de bacilles à Gram négatif, mais avec toujours présence de bacilles à Gram positif. Toute perturbation notable de cet équilibre doit être signalée.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

La finalité de la coproculture consiste à tenter d'isoler au sein d'une flore complexe un nombre limité d'espèces réputées pathogènes. La flore colique de l'adulte se caractérise en effet par une grande densité et une extraordinaire diversité. Elle contient de 10^9 à 10^{10} bactéries par gramme renfermant plus de 400 espèces différentes dont la très grande majorité est anaérobie stricte. Les Entérobactéries ne représentent que 5 à 10% de cette flore et parmi lesquelles *Escherichia coli* prédomine. Entérocoques, streptocoques, staphylocoques, lactobacilles et levures sont aussi présents mais en moins grande quantité.

Principaux micro-organismes responsables de diarrhées	
Bactéries	<i>Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, Vibrio, Aeromonas, Staphylococcus, Bacillus, Clostridium</i>
Virus	<i>Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus, Agent de Norwalk</i>
Protozoaires	<i>Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, Balantidium</i>
Helminthes	<i>Schistosoma, Strongyloides, Ancylostoma, Necator, Trichuris, Trichinella</i>

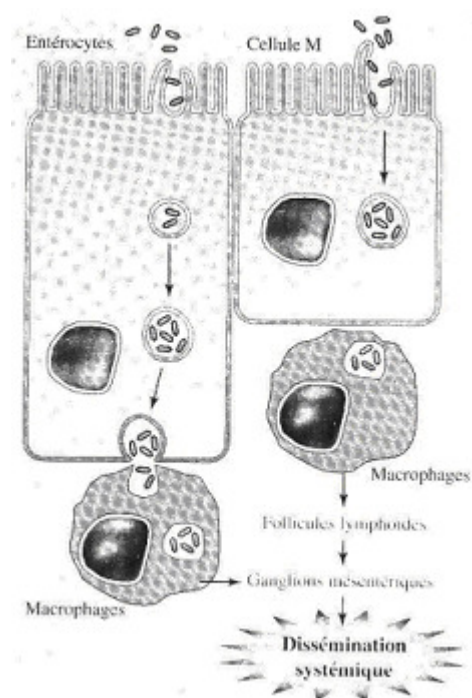
En milieu hospitalier, on peut rechercher, dans les selles, une bactérie d'infection nosocomiale (par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* chez le nouveau né) une souche résistante particulière à un antibiotique (Entérocoque résistant à la vancomycine ou Entérobactérie productrice d'une bêtalactamase à spectre étendu).

Lors d'une épidémie documentée on peut être amené à rechercher un portage de la bactérie pathogène dans l'entourage d'un patient ou parmi le personnel soignant. Cette coproculture se pratique sur des selles mêmes solides.

Chez les cuisiniers le dépistage de bactéries entéropathogènes (*Staphylococcus aureus, Salmonella*), s'il reste légal, a une valeur discutable.

A Les bactéries entéro-invasives

Les *Salmonella* représentent encore aujourd'hui en France la principale cause de gastro-entérite bactérienne. La transmission se fait par les aliments souillés ou par porteur asymptomatique. Le tableau est celui d'une gastro-entérite aiguë. ***Salmonella* envahit l'entérocyte puis traverse la muqueuse et pénètre dans le tissu sous-muqueux où elle se multiplie.** L'invasion de la muqueuse intestinale par les *Salmonella* requiert l'adhésion des bactéries à des récepteurs cellulaires spécifiques. La fixation des *Salmonella* sur ces récepteurs active une phosphorylase et déclenche ainsi une série de réactions aboutissant au remaniement du cytosquelette et au gonflement des microvillosités. Une vacuole d'endocytose se forme, les salmonelles s'y multiplient. La vacuole migre vers la membrane latérobasale et est expulsée de la cellule. Les bactéries sont prises en charge par les macrophages. Si elles sont éliminées, l'infection reste localisée et n'atteint pas le stade de la septicémie (coproculture + et hémoculture -). Dans le cas inverse, les *Salmonella* sont déversées dans le sang et sont responsables d'un épisode septicémique (coproculture + et hémoculture +).



Toute coproculture doit systématiquement mettre en oeuvre la recherche de *Salmonella* et de *Shigella*. Outre un milieu sélectif d'isolement (**gélose SS, XLD, ou Hektoen**), un milieu d'enrichissement pour *Salmonella* est indispensable. Différents bouillons peuvent être proposés (**Mueller-Kauffmann, Sélénite**). Il est préconisé de repiquer le milieu d'enrichissement sur gélose sélective après 3 à 6 heures d'incubation à 37°C, afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales moins bien inhibées passé ce laps de temps. Leur identification complète jusqu'au « **sérovar** » précis ne se justifie que pour les plus fréquents ou les plus pathogènes.

La recherche de *Campylobacter* spp est systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides. La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Buztler). **Les cultures sont incubées pendant 48 heures minimum en micro-aérophilie.**

La recherche de *Yersinia enterocolitica* n'est pratiquée que chez les enfants dont les selles sont diarrhéiques ou les adultes dans un contexte de polyarthrite réactionnelle. Les selles peuvent être placées dans un milieu d'enrichissement (milieu de Rappaport), incubées 24 h à 48 h à + 4°C et repiquées sur milieu spécifique pour *Yersinia* (**milieu à l'Irgasan-cefsulodine et novobiocine ou CIN**) incubé pendant 48 h à 30°C.

Les *E. coli* **entéropathogènes (EPEC)** responsables de diarrhée chez l'enfant de moins de deux ans se recherchent sur milieu type **EMB ou Drigalski**. En cas de **syndrome hémolytique et urémique (SHU)**, l'isolement de *E. coli* **entérohémorragique O157 (EHEC)** s'effectue sur gélose **Mac Conkey au sorbitol ; les colonies sorbitol négatif sont agglutinées avec un latex sensibilisé.**

En cas de voyage récent en « pays tropical » et syndrome cholériforme, *V. cholerae* se recherche directement et après enrichissement en eau peptonée alcaline repiquée toutes les 3 heures sur milieu **TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)**.

Cas particulier : les diarrhées secondaires à un traitement antibiotique (dysmicrobisme)

Clostridium difficile est responsable d'une diarrhée de moyenne importance accompagnant une antibiothérapie. Plus rarement le tableau évolue vers celui d'une **colite pseudomembraneuse**. Primitivement liée à un déséquilibre de la flore intestinale, la diarrhée est due à la **germination des spores de *C. difficile*** puis à la sécrétion de l'**entérotoxine A** et de la **cytotoxine B**. *C. difficile* est également à l'origine d'**infections nosocomiales**.

La technique de référence reste la **mise en évidence de la cytotoxine** dans les filtrats de selles et ne s'impose que pour des malades sous traitement antibiotique ou présentant une colite pseudo-membraneuse. La recherche d'un **effet cytopathogène** sur des cultures cellulaires (fibroblastes, cellules Vero, MRC-5). Cette méthode est sensible et d'une excellente spécificité lorsque **l'effet cytopathogène est neutralisé par un antisérum spécifique**. La lecture s'effectue au bout de 24 à 48 heures.

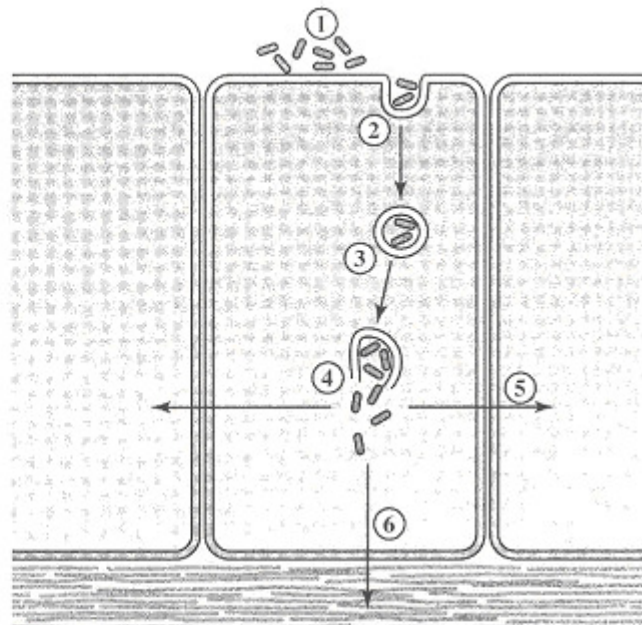
L'isolement de *Shigella* est en constante régression en France. La transmission est inter-humaine. Le tableau est celui d'un **syndrome dysentérique**. *Shigella* pénètre dans les cellules épithéliales intestinales et s'y multiplie jusqu'à leur destruction (cette destruction n'est pas observée avec *Salmonella*).

La colonisation de la muqueuse intestinale par les *Shigella* peut être schématiquement décomposée en plusieurs étapes. L'adhésion bactérienne est suivie de la formation d'une vésicule d'endocytose emprisonnant les germes. Ce sont en fait les bactéries elles-mêmes qui induisent la formation de la vésicule, les entérocytes sont, en effet, dépourvus de propriétés de phagocytose.

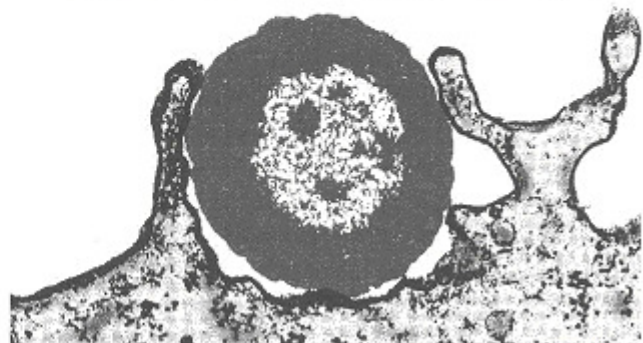
Cette vésicule est rapidement détruite et libère les bactéries dans le cytoplasme où les *Shigella* se multiplient (4). La mort cellulaire résulte de l'action d'une toxine protéique inhibant les synthèses protéiques et provoquant la fuite d'eau et d'électrolytes.

La cellule détruite, les bactéries envahissent les cellules voisines (5). Ainsi, l'infection se propage-t-elle horizontalement. Dans un deuxième temps, se produit une extension verticale de l'infection (6) : le chorion (tissu conjonctif) est atteint, une réaction inflammatoire plus ou moins intense se développe du fait de l'irrigation importante de cette zone (les polynucléaires quittent les vaisseaux pour se diriger sur le lieu de l'infection). Il se forme des microabcès et des ulcérations de la muqueuse. Dans la plupart des cas, les *Shigella* ne passent pas dans le sang car la réaction inflammatoire est suffisante pour les éliminer. Ceci explique la régression des troubles en 24 à 48 heures. La coproculture (recherche des germes dans les selles) est positive, l'hémoculture est négative.

Entrée par phagocytose induite de *Shigella flexneri* dans une cellule épithéliale HeLa.
(Notez la formation de pseudopodes aboutissant à l'internalisation de la bactérie)



Mécanisme des toxi-infections alimentaires à tropisme intestinal, mettant en jeu des *Shigella*



La contamination par *Campylobacter* (*C. coli* ou *C. jejuni*) est essentiellement alimentaire (volailles et porc) ou par l'intermédiaire de porteurs asymptomatiques. Ces bactéries représentent désormais la seconde cause de gastro-entérite bactérienne en France. Elle peut s'internaliser dans des vacuoles intracytoplasmiques et également sécréter des toxines.

La porte d'entrée de *Yersinia enterocolitica* est alimentaire (animaux de boucherie). Sa multiplication est facilitée par sa psychrophilie (à faible température). Son isolement n'est pas fréquent. *Y. enterocolitica* est une **bactérie invasive** se manifestant le plus souvent par une gastro-entérite fébrile avec douleurs abdominales. Au stade des complications articulaires, sa détection dans les selles s'avère aléatoire.

Chez les enfants de moins de 2 ans, il est classique de rechercher les *Escherichia coli* entéro-pathogènes (EPEC) dans les selles liquides de nourrissons présentant un tableau de fièvre avec déshydratation. Dans cette tranche d'âge les causes principales restent d'origine virale (Rotavirus, Adenovirus).

Il existe des méthodes rapides **immunoenzymatiques**, alliant rapidité de détection et facilité d'emploi : détection de la toxine A ou celle des deux toxines A et B avec des délais de réponses inférieurs à trois heures. En outre, un test immunofluorométrique est automatisé (Vidas *Clostridium difficile* toxine A).

Des méthodes de biologie moléculaire par **amplification génique** *in vitro* sont décrites avec des amorces de séquences du gène de la toxine A, ou par hybridation directe à partir des filtrats de selles pour la toxine B.

La recherche de la bactérie par culture nécessite des milieux spécifiques : **gélose Columbia au sang à la céfoxitine, cyclosérine et fructose incubée en anaérobiose** pendant 48 heures.

2.4. Traitement et prévention

L'antibiogramme est impératif pour *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* et pour *V. cholerae* en milieu endémique (**prophylaxie par les sulfamides**). En tout état de cause il est parfaitement légitime de pratiquer un antibiogramme pour toutes bactéries pathogènes isolées de coproculture.

La **lutte contre le péril fécal** et le cortège des maladies qu'il peut transmettre passe avant tout par le maintien, l'amélioration ou la **mise en oeuvre des mesures d'hygiène générales**, individuelles et collectives, selon le degré de développement des pays considérés. Les **vaccins** ont une place dans la prévention de ces maladies. Elle est même essentielle pour contrôler les **maladies virales** dont les agents pathogènes résistent au traitement habituel des eaux de boisson. En revanche, contre les maladies bactériennes dont les agents pathogènes sont détruits par la chloration de l'eau, la prophylaxie vaccinale ne devrait être théoriquement que secondaire. En fait, devant les difficultés souvent rencontrées dans de nombreux pays pour améliorer les conditions d'hygiène, afin de limiter la morbidité et la mortalité importantes liées à certaines maladies, la recherche de nouveaux vaccins efficaces est actuellement encouragée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

Les progrès réalisés dans le domaine des biotechnologies permettent d'envisager, à plus ou moins long terme, le contrôle des principales maladies d'origine bactérienne et virale liées au péril fécal. Contre les maladies diarrhéiques d'origine bactérienne, de nombreuses approches vaccinales sont en cours d'étude, contre les shigelloses (vaccins polysidiques conjugués injectables ou vaccins vivants atténués), contre les *Escherichia coli* entérotoxigènes et *Vibrio cholerae* (vaccin inactivé administrable *per os* constitué de plusieurs souches d'ETEC et la sous-unité B de la toxine cholérique).

Bibliographie :

REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr).

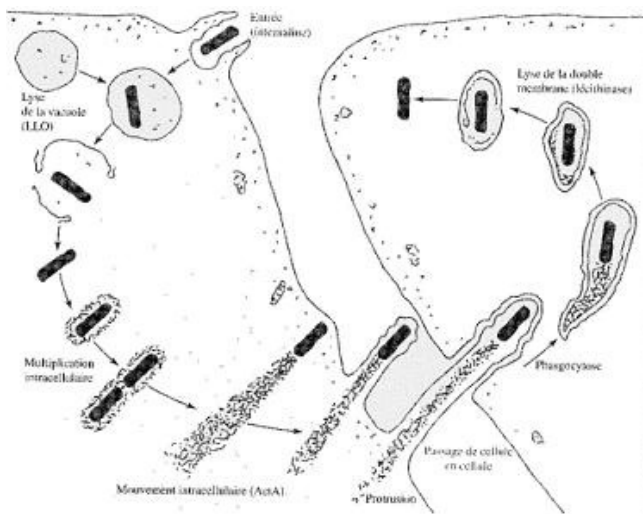
Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires ;

Guy Leyral , Elisabeth Vierling ; CRDP Aquitaine.

Les vaccins dans la prévention du péril fécal ; P. Saliou ;

<http://www.pathexo.fr/documents/articles-bull/1998/1998n5/T91-5-PF14.pdf>

Dans le méconium du nouveau né, on se limite à la recherche de bactéries responsables d'infections néonatales : *Listeria monocytogenes*, *E. coli* K1 et surtout *Streptococcus agalactiae* (groupe B).



Mécanismes du pouvoir invasif de *Listeria monocytogenes*

La pénétration des *Listeria* est principalement réalisée au niveau des macrophages et des monocytes. Plusieurs protéines constitutives de la bactérie interviennent successivement pour expliquer le processus invasif.

1 - L'internaline, protéine de surface, commune à d'autres bactéries à Gram+, facilite l'adhésion et provoque (par liaison avec les intégrines cellulaires) des modifications du cytosquelette, entraînant la formation d'un phagosome. 2 - À l'intérieur du phagosome, les *Listeria* subissent des conditions défavorables susceptibles d'entraîner leur destruction : acidification par les pompes à protons, burst oxydatif. L'action d'une protéine cytolitique, la listériolysine, associée à une phosphatidyl-inositol phospholipase, conduit à leur libération par éclatement de la vésicule. La survie de *Listeria monocytogenes* dépend donc de la rapidité d'action de ces substances.

3 - L'action d'une autre protéine, l'ACT A, conduit à la polymérisation, autour de la bactérie, de l'actine F pour produire de l'actine G qui permet leur déplacement à l'intérieur du phagocyte à une vitesse de 1 µm par seconde. Les *Listeria* peuvent ainsi envahir les cellules voisines et s'y multiplier.

In vivo, les *Listeria*, parvenues dans l'intestin avec les aliments ingérés, pénètrent la paroi intestinale au niveau des plaques de Peyer (qui contiennent des macrophages). La propagation se fait ensuite vers les entérocytes. Elles gagnent le chorion et pénètrent dans les vaisseaux afin d'atteindre les organes cibles privilégiés que sont le système nerveux central et le foie.

B Les bactéries entéro-toxinogènes

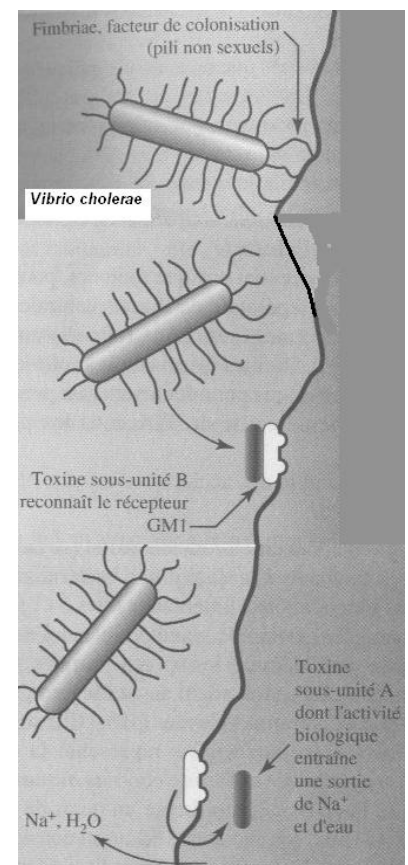
Les **entérotoxines bactériennes** sont généralement responsables de **diarrhées** caractérisées par l'émission fréquente de **selles liquides**. L'exemple type de ces diarrhées sécrétoires est le choléra.

Le mécanisme d'action de la toxine cholérique peut être décrit en quatre étapes :

1. les bactéries (*Vibrio cholerae*) **adhèrent à la muqueuse** par l'intermédiaire de leur **pili**, au niveau de **récepteurs spécifiques des entérocytes** ;
2. cette adhésion entraîne la **libération de la toxine**, qui se fixe sur les **récepteurs gangliosidiques GM1** par l'intermédiaire de la **sous-unité B** (« binding ») ;
3. la fixation de la sous-unité B permet l'**entrée de la sous-unité A** (« active ») **dans la cellule** ;
4. l'activation de l'**adénylate cyclase** par la sous-unité A accroît considérablement la concentration en **AMPc** dans les entérocytes, ce qui provoque une **sortie massive d'eau et d'électrolytes** vers la **lumière intestinale**.

Les selles des diarrhées entérotoxiques sont dépourvues de sang et de leucocytes : il n'y a pas de réaction inflammatoire. Les **toxines thermolabiles (LT)** des *Escherichia coli* **entérotoxiques (ETEC)** présentent des propriétés identiques et agissent selon un mécanisme comparable, de même que chez *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et probablement d'autres bactéries chez qui les mécanismes physiopathologiques ne sont pas clairement identifiés.

Les *Escherichia coli* 0157 entéro-hémorragiques (EHEC) expriment leur pouvoir pathogène au moyen d'une cytotoxine (vérotoxine). Celle-ci est responsable de diarrhées hémorragiques qui peuvent secondairement se compliquer, surtout chez l'enfant, d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU).



3. Infections de la sphère O.R.L et infections oculaires

(oto-rhino-laryngologie = étude de l'oreille du nez et du larynx)

3.1. Signes cliniques

Les angines érythémateuses

Ce type d'angine représente plus de 80 % des angines.

— Les circonstances de découverte :

Survenant le plus souvent chez l'enfant avant 10 ans, les angines érythémateuses ou érythémato-pultacées sont d'installation rapide, en moins de 12 heures, se manifestant par :

- une douleur pharyngée exacerbée lors de la déglutition (odynophagie) associée parfois à une otalgie ;
- un état fébrile (38°-5-39°) avec asthénie et frisson ;
- parfois des céphalées, des nausées voire des vomissements.

L'aspect clinique varie suivant le type d'angine. Dans le cas de :

- l'angine érythémateuse, le pharynx est uniformément rouge avec une augmentation de volume plus ou moins importante des amygdales. Très contagieuse, l'origine de ce type d'angine semble être souvent virale ;
- l'angine érythémato-pultacée, le pharynx est uniformément rouge et les amygdales sont augmentées de volume et couvertes d'un enduit blanchâtre parfois gris-jaunâtre. De petites lésions pétéchiales peuvent s'observer sur le voile du palais (évacatrices de MNI). La lèvre est souvent œdématisée.

A part, l'angine streptococcique avec rash : les angines de la scarlatine. L'exanthème scarlatiniforme apparaît 24 heures après le début de l'angine et signe la scarlatine.

Otitis

Certains signes attirent d'emblée l'attention sur l'oreille :

- otalgie
- enfant grognon se touchant l'oreille
- otorrhée purulente.

Des signes généraux peuvent également révéler une OMA

- fièvre parfois importante
- troubles digestifs : vomissements, diarrhée
- troubles du sommeil et du comportement, anorexie.



Rhinopharyngite aiguë :

Il s'agit d'un tableau extrêmement fréquent dont le diagnostic est habituellement aisé :

- une fièvre, rarement supérieure à 38°5 en l'absence de complications ;
- une obstruction nasale avec rhinorrhée antérieure et postérieure muqueuse ou muco-purulente. Cette obstruction nasale provoque une respiration buccale bruyante ;
- certains signes d'accompagnement non spécifiques peuvent exister : irritabilité, vomissements, diarrhée.

L'examen clinique permet de noter :

- inflammation des muqueuses nasales et pharyngées ;
- écoulement pharyngé postérieur muqueux ou muco-purulent ;
- adénopathies cervicales bilatérales sensibles ;
- à l'otoscopie, des tympan congestifs, dépolis et modérément rétractés.

Les sinusites bilatérales

Les signes révélateurs d'une sinusite chronique bilatérale peuvent être variés :

- une rhinorrhée bilatérale antérieure et/ou postérieure, plus ou moins claire ou purulente ;
- une obstruction nasale souvent bilatérale, parfois à bascule, variant dans le temps ;
- une hyposmie ou une anosmie ;
- des douleurs faciales surtout lors des poussées de réchauffement, parfois des céphalées qui peuvent être invalidantes ;
- une toux irritative secondaire à une rhinorrhée chronique postérieure qui se majore souvent la nuit du fait du décubitus ;
- des stigmates de dysfonctionnement tubaire uni- ou bilatéral.

3.2. Prélèvement

Au cours des angines aiguës, la prescription de l'examen cyto-bactériologique d'un prélèvement de gorge est devenu rare. **Le prélèvement doit être réalisé avant toute antibiothérapie locale ou générale.** On procède à l'écouvillonnage des amygdales (ou de l'amygdale atteinte en cas d'amygdalite unilatérale) ou, en leur absence, de la paroi postérieure du pharynx. On utilise deux écouvillons dont l'un sert à effectuer extemporanément un étalement sur lame, l'autre étant destiné à la mise en culture.

Pus de paracentèse : le prélèvement est effectué par l'oto-rhino-laryngologiste, après nettoyage du conduit auditif externe puis incision du tympan, à l'aide d'écouvillons fins (alginate ou dacron) montés sur tige métallique. **Otitis chroniques ou externes :** le prélèvement est en général effectué à l'aide de deux écouvillons fins, l'un servant à réaliser extemporanément un étalement sur lame, l'autre étant destiné à la mise en culture.

Pus de sinus ou de fosses nasales : aspiration de pus de sinus au méat moyen réalisé par l'ORL ou prélèvement effectué par écouvillonnage.

Les **prélèvements oculaires** concernent essentiellement les prélèvements conjonctivaux soit pour un examen préopératoire (le prélèvement doit alors être réalisé immédiatement avant l'intervention chirurgicale) soit pour diagnostiquer une conjonctivite (le prélèvement sera effectué avant toute toilette faciale au niveau de l'angle interne de l'œil).

Dans tous les cas, un milieu de transport permettant notamment la survie des bactéries anaérobies est à prévoir si la mise en culture ne peut être effectuée dans un délai de moins de 2 heures.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

A Angines

Contexte	Principaux objectifs
Angine aiguë ou contexte par défaut	Isolement de <i>Streptococcus pyogenes</i> (groupe A), et des Streptocoques B-hémolytiques des groupes C et G Si l'angine s'accompagne d'un rash cutané : recherche de <i>Streptococcus pyogenes</i> et de <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (en particulier chez l'adulte jeune) En cas d'angine récidivante, recherche complémentaire possible (mais le rôle de ces bactéries n'est pas clairement établi) de : <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i>
Angine ulcéro-nécrotique	Mise en évidence de l'association fusospirochétienne caractéristique de l'angine de Vincent
Angine à fausses membranes (ou sujets -contacts)	Isolement de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
Candidose oropharyngée	Mise en évidence de <i>Candida albicans</i>
Bilan initial d'une MST	Isolement de <i>N. gonorrhoeae</i>
Pneumonie interstitielle	La mise en évidence de <i>Chlamydia pneumoniae</i> dans le prélèvement de gorge peut être envisagée
Phlégmon de l'amygdale	Examen cyto-bactériologique du produit de la ponction évacuatrice avec recherche de <i>S. pyogenes</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. aureus</i> , anaérobies (<i>Fusobacterium</i> spp, <i>B. fragilis</i> , <i>Peptostreptococcus</i> spp)

B Otites

Contexte	Principaux objectifs
Pus de paracentèse ou otorrhée spontanée au cours d'une OMA <i>Une paracentèse est une opération chirurgicale sous anesthésie locale ou générale consistant à percer les tympans. Cette intervention traite la douleur provoquée par la pression due à des sécrétions contenues dans la cavité tympanique lors d'une otite moyenne aiguë (OMA).</i>	Chez l'enfant de plus de 3 mois et l'adulte : Mise en évidence de <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Alloicoccus otitidis</i> et <i>Turicella otitidis</i> Chez le nourrisson de moins de 3 mois : Mêmes bactéries plus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Entérobactéries (<i>E. coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i>) et <i>Streptococcus pyogenes</i> (groupe A)
Sécrétions mucopurulentes au cours d'une otite chronique	Mise en évidence de <i>P. aeruginosa</i> , Entérobactéries (<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>), <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> et anaérobies
Sécrétions mucopurulentes au cours d'une otite externe	Mise en évidence de <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , Entérobactéries (<i>E. coli</i> , <i>P. mirabilis</i>), <i>Candida</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp. (<i>niger</i> le plus souvent)

3.3. Diagnostic

Streptococcus pyogenes (du groupe A) est le principal agent étiologique des angines bactériennes. Malgré l'existence de trousse de détection rapide, la culture demeure la méthode microbiologique de référence pour la mise en évidence de cette bactérie. La sensibilité de la culture est en effet de 90-95 % contre 80-90 % dans le meilleur des cas pour les trousse de détection rapide. D'autres streptocoques (groupes C et G) sont possibles.

L'examen microscopique après coloration de Gram a surtout pour but de signaler la **présence ou l'absence de leucocytes**, témoins de l'inflammation, **mettre en évidence l'association fusospirochétienne caractéristique de l'angine de Vincent**, éventuellement décrire la flore de façon sommaire.

L'examen direct n'a pas d'intérêt pour les prélèvements avant chirurgie oculaire. Pour les autres prélèvements, deux frottis peuvent être réalisés : le premier pour la coloration de Gram qui permettra de décrire la flore dominante ; le deuxième pour une coloration de Giemsa à partir de laquelle l'aspect cytologique sera étudié, en particulier la présence de polynucléaires. D'autres frottis pourront être réalisés selon le contexte clinique pour **mettre en évidence *Chlamydia trachomatis* par immunofluorescence**, ou à l'état frais, des amibes libres chez les porteurs de lentilles cornéennes.

Il convient ensuite d'ensemencer les milieux de culture appropriés aux objectifs de chaque contexte.

Angine aiguë ou contexte par défaut : gélose au sang avec ou sans mélange inhibiteur (type ANC), incubée sous 10 % de CO₂ ou en anaérobiose. L'anaérobiose est recommandée, notamment pour une meilleure mise en évidence de l'hémolyse β.

Pour les autres contextes, les milieux seront appropriés aux micro-organismes recherchés :

- *Haemophilus influenzae* : gélose au sang cuit ou gélose chocolat enrichie en mélange polyvitaminique incubée en atmosphère renfermant 10 % de CO₂ avec ou sans bacitracine,
- *S. aureus* : gélose au sang sans inhibiteur ou gélose ordinaire,
- *Moraxella catarrhalis* : bien que se développant sur milieu ordinaire, la détection est plus rapide et plus facile sur gélose chocolat,
- *Neisseria gonorrhoeae* : gélose chocolat enrichie en mélange polyvitaminique additionnée d'un mélange inhibiteur (type VCAT : (Vancomycine, Colimycine, Amphotéricine = antifongique, Triméthoprime) et incubée sous 10 % de CO₂,
- *Corynebacterium diphtheriae* : milieu de Tinsdale modifié,
- *Candida albicans* : milieu Sabouraud + chloramphénicol ou gentamicine incubé à 30°C.

3.4. Traitement et prévention

Un antibiogramme sera réalisé notamment dans le cas d'une infection à *Streptococcus pyogenes*, il comportera l'étude minimum de la pénicilline G, de l'érythromycine, et de la lincomycine, et de la tétracycline. Dans les autres contextes, la réalisation de l'antibiogramme dépend notamment de la quantité de micro-organismes isolés. **Dans le cas où le rôle de *H. influenzae* et *M. catarrhalis* n'est pas clairement établi, il est nécessaire d'effectuer, pour ces deux bactéries, une recherche de β-lactamase.**

C. Sinusites et rhino-pharyngites

Contexte	Principaux objectifs
Pus de fosses nasales (sinusite, parfois rhinopharyngite)	Mise en évidence de <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Moraxella (Branhamella) catarrhalis</i> et <i>S. aureus</i>
Prélèvement de fosses nasales dans le bilan d'une staphylococcie récidivante	Mise en évidence de <i>S. aureus</i>
Pus de sinus par aspiration au méat moyen lors d'une sinusite aiguë	Chez l'enfant : Mise en évidence de <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> Chez l'adulte : Mise en évidence de <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , anaérobies, <i>Streptococcus pyogenes</i> (groupe A)
Pus de sinus par aspiration au méat moyen lors d'une sinusite chronique	Idem sinusite aiguë + bacilles à Gram (-) aérobies + anaérobies (<i>Fusobacterium</i> spp, <i>Prevotella</i> spp) + <i>Aspergillus</i> spp
Prélèvement rhinopharyngé au cours d'une suspicion de coqueluche	Mise en évidence de <i>Bordetella pertussis</i>

D. Conjonctivites

Contexte habituel (ou par défaut)	Contextes particuliers
<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , Entérobactéries, <i>Moraxella</i> spp	Adulte immunodéprimé : <i>Pseudomonas</i> , Entérobactéries, levures Nourrisson et petit enfant : <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>P. aeruginosa</i> . Afrique et pays en voie de développement : • <i>M. tuberculosis</i> , <i>C. diphtheriae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Haemophilus aegyptius</i> . • <i>Chlamydia trachomatis</i> .

Bibliographie :

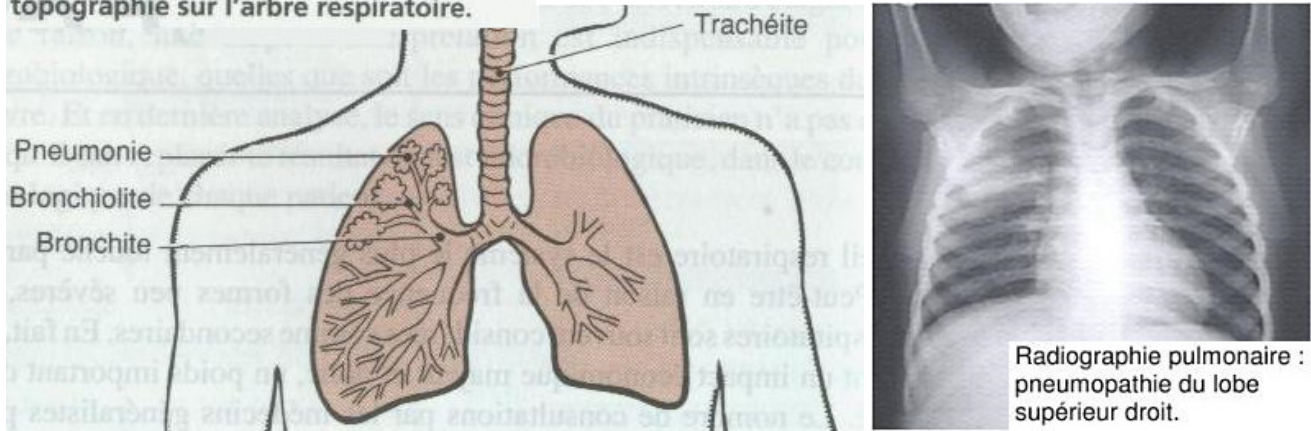
REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr).

O.R.L.: Edition 2002-2003 ; Denis Ayache, Pierre Bonfils ; Estem

4. Infections bronchiques et pulmonaires

4.1. Signes cliniques

Syndromes cliniques des infections respiratoires en fonction de la topographie sur l'arbre respiratoire.



Radiographie pulmonaire : pneumopathie du lobe supérieur droit.

Signes généraux	Bronchiolite	Pneumonie	Bronchite
- début	progressif	brutal	progressif
- fièvre	variable	> 38,5°	variable
- rhinorrhée	variable	-	++
- toux	++	+	++
- tachypnée	++	+	-
- geignements	++	+	-
- lutte	+++	+	-

4.2. Prélèvement

De nombreuses espèces bactériennes responsables d'infections pulmonaires peuvent être présentes à l'état de commensales dans l'oropharynx et la salive. Ce sont notamment de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, des bactéries anaérobies strictes.

Une attention extrême doit être portée aux conditions de recueil de ces prélèvements. **Il faut éviter la présence de salive** qui risque de diluer la flore pathogène et de la contaminer par des bactéries commensales. Sont considérées comme bactéries salivaires : staphylocoques à coagulase négative, streptocoques autres que *S. pneumoniae*, corynébactéries, *Neisseria* commensales... Pour remédier à cet écueil important, plusieurs mesures sont préconisées : **éliminer les prélèvements dont l'examen microscopique montre une contamination salivaire évidente** ; procéder à une analyse quantitative de la flore bactérienne ; recueillir les sécrétions pulmonaires des malades ayant une pneumopathie grave au moyen de méthodes invasives mais plus fiables : **brossage bronchique protégé** et **lavage broncho-alvéolaire**. Dans les pneumopathies graves, l'examen bactériologique des sécrétions pulmonaires est complété utilement par la pratique d'**hémocultures**.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

Chez le sujet sain

- virales dans 90% des cas (rhinovirus +++, écovirus, adénovirus, herpès virus, virus influenzae et parainfluenzae, virus respiratoire syncytial...)
- *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*
- *Bordetella pertussis*
- mycoses (*Candida albicans* ou *Aspergillus*) : surviennent dans des contextes particuliers (immunodépression sévère, après antibiothérapie prolongée à large spectre)

Infections broncho-pulmonaires de l'enfant

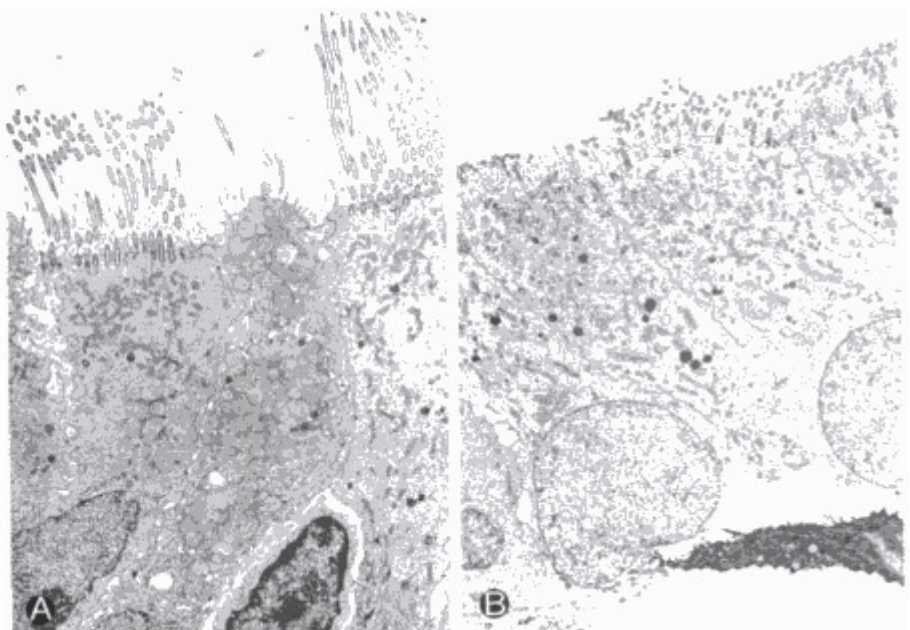
- bactériennes (50%) :
 - pneumocoque (y penser avant 2 ans +++)
 - mycoplasme (y penser après 5 ans +++, penser à la sérologie)
 - *Haemophilus influenzae* (conjonctivite)
 - *Moraxella catarrhalis*
- virales (40%) :
 - VRS
 - adénovirus
 - rhinovirus
 - influenzae A et B
 - parainfluenzae 1, 2,

Micro-organismes responsables d'infections broncho-pulmonaires

	Pneumopathies		Surinfections bronchiques	Mucoviscidose
	communautaires	nosocomiales		
<i>S. pneumoniae</i>	■	■	■	■
<i>H. influenzae</i>	■	■	■	■
<i>S. aureus</i>	■	■	■	■
<i>M. catarrhalis</i>	■	■	■	■
<i>K. pneumoniae</i>	■	■	■	■
Autres BGN	□	■	■	■
<i>P. aeruginosa</i>	□	■	■	■
<i>Burkholderia cepacia</i>	□	■	□	■
Mycobactéries	●	●	●	□
<i>Nocardia</i>	●	●	□	□
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	●	●	□	□
<i>Mycoplasma</i>	●	●	□	□
<i>Legionella</i>	●	●	□	□
<i>Coxiella</i>	●	□	□	□
Anaérobies	□	●	□	□
<i>Candida</i>	□	●	□	□
<i>Aspergillus</i>	□	●	□	●

■ à rechercher dans tous les cas ● à rechercher dans des circonstances particulières
 □ à rechercher de façon exceptionnelle

Coupe en microscopie électronique d'un épithélium nasal d'un enfant sain (A), et d'un enfant atteint d'infection à adénovirus (B). L'épithélium nasal en A est caractéristique d'un épithélium pseudostratifié en cylindres, délimitant les voies aériennes de gros diamètre. Les cellules ciliaires normales sont retrouvées de chaque côté des cellules muqueuses qui sont gonflées de sécrétions. B montre une ultrastructure altérée avec disparition des cellules ciliaires au cours d'une infection virale.



Le recueil de l'**expectoration** doit respecter un protocole rigoureux : il doit se faire le matin, au réveil, après rinçage bucco-dentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux aidé, si besoin d'une kinésithérapie. L'examen bactériologique doit être effectué sans délai. Cet examen a une valeur informative à condition que le recueil de l'expectoration soit de bonne qualité et que celle-ci soit confirmée par l'examen microscopique. Une signification clinique sera accordée uniquement à l'espèce prédominante si elle atteint ou dépasse le seuil de 10^7 bactéries/mL.

Brossage bronchique protégé

- ◆ La référence demeure le dispositif de Wimberley constitué d'une brosse en nylon fixée à l'extrémité d'un guide métallique. Brosse et guide coulisent à l'intérieur d'un premier cathéter, lui-même placé à l'intérieur d'un second cathéter, obturé par un bouchon de polyéthylène glycol.
- ◆ Cette brosse télescopique est glissée au travers d'un fibroscope et dirigée sous contrôle de la vue dans une petite bronche de 4^e ordre drainant le territoire pulmonaire radiologiquement suspect. Le cathéter interne est alors poussé, expulsant le bouchon et permettant d'avancer la brosse de quelques centimètres, pour réaliser le prélèvement bactériologique.
- ◆ Après cela les manœuvres inverses sont effectuées : on désinfecte alors la partie externe du cathéter interne par de l'alcool à 90°C, puis on fait sortir la brosse interne et on la coupe avec des ciseaux stériles pour qu'elle tombe dans 1 ml de liquide (eau physiologique tamponnée stérile ou liquide de Ringer) que l'on agite sur place au lit du malade (agitation mécanique de type vortex) pendant 2 min. Le prélèvement est apporté sans délai au laboratoire.
- ◆ Après avoir prélevé la quantité nécessaire à la culture on réalise une coloration de Gram sur le culot de centrifugation. La culture quantitative s'effectue dans les conditions décrites plus haut.
- ◆ Un seuil de 10^3 UFC/ml est considéré comme significatif. La sensibilité et la spécificité sont de l'ordre de 70 % c'est à dire qu'il est observé environ 30 % de faux négatifs.
- ◆ Le seuil de significativité peut être abaissé à 5.10^2 UFC/ml notamment chez les malades recevant des antibiotiques.

Lavage broncho-alvéolaire

- ◆ La technique consiste à instiller après blocage du bronchofibroscope dans une bronche segmentaire ou sous-segmentaire des échantillons de 50 ml de sérum physiologique (à 37°C) 4 à 6 fois et on ramène entre 20 et 60 % de la quantité injectée.
 - ◆ Le LBAa plusieurs avantages : possibilité d'examen microscopique du culot de centrifugation du liquide, exploration d'un territoire pulmonaire plus important que le BBP, recueil d'une plus grande quantité de sécrétions.
 - ◆ Chez les malades intubés et ventilés, suspects de pneumonie nosocomiale, la concordance entre BBP et LBAest de 90 % environ.
 - ◆ Le traitement des échantillons consistera à :
 - centrifuger 30 à 40 ml de liquide dans un tube conique stérile à 5000 tours pendant 10 minutes ;
 - à partir du culot, faire des frottis et procéder aux colorations suivantes : Gram, Ziehl-Neelsen (Gram-Weigert ou Gomori-Grocott pour la recherche de *Pneumocystis*), immunofluorescence directe pour la recherche de *Legionella*.
- La prise en compte et la numération des cellules (> à 7 %) du lavage broncho-alvéolaire contenant des bactéries intracellulaires permettrait de prédire dès l'examen direct l'existence d'une pneumopathie bactérienne chez les malades ventilés.
- ◆ Les cultures et le dénombrement sont réalisés dans les conditions indiquées plus haut.
 - ◆ Un dénombrement des germes banaux supérieur à 10^4 UFC/ml est généralement considéré comme significatif d'une pneumonie.

LES MYCOBACTERIES

Contextes cliniques :

- 1) Recherche des mycobactéries devant des signes cliniques évoquant la **tuberculose** où sont très souvent impliquées les mycobactéries du complexe *tuberculosis* : *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*.
- 2) Recherche des mycobactéries devant des lésions diverses, susceptibles d'être rattachées à une mycobactériose provoquée par une mycobactéries non tuberculeuses. Selon les organes, on rencontre avec une plus grande fréquence les mycobactéries suivantes : *Mycobacterium avium* et *intracellulare*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. malmoense*...

Démarche d'identification :

1) Mettre en évidence des Bacilles Acido-Alcool Résistants (B.A.A.R.) ;

L'examen microscopique est réalisé sur les frottis du produit pathologique ou du culot de centrifugation obtenu après fluidification-décontamination des produits pathologiques contaminés. Deux colorations sont utilisées : la **coloration de Ziehl-Neelsen** et la **coloration à l'auramine**.

- Dans la technique de Ziehl-Neelsen, la fuchsine colore en rouge les bacilles qui conservent cette coloration après traitement par l'acide nitrique ou sulfurique dilué et par l'alcool. Le fond de la préparation est ensuite coloré au bleu de méthylène. Les bacilles Acido-Alcool-Résistants (B.A.A.R.) apparaissent rouge sur fond bleu. La lecture se fait à l'objectif à immersion (x100). Elle est longue car le champ observé est petit.
- L'auramine se fixe sur le bacille et le rend fluorescent, après traitement à l'acide-alcool et contre-coloration du fond de la préparation. Celle-ci est examinée au microscope en fluorescence (x25). La lame est explorée plus rapidement, le champ observé étant plus grand qu'à l'immersion. Les B.A.A.R. apparaissent fluorescents, brillants sur fond noir de la préparation.

2) Observer l'apparition d'une culture : vérifier qu'il s'agit de B.A.A.R. et identifier la mycobactérie.

Le milieu de **Löwenstein-Jensen**, milieu à l'oeuf, est le milieu de référence recommandé par l'UICTMR (Union Internationale Contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires).

Après un **temps d'incubation variable selon les espèces**, les cultures positives sont soumises aux épreuves d'identification. Que la culture ait été obtenue sur milieu solide ou sur milieu liquide, le premier temps de l'identification consiste à vérifier le **caractère acido-alcool-résistant des bactéries par coloration de Ziehl**. On note également le **délai d'apparition des colonies**, on vérifie l'existence d'un seul type de colonies. **L'aspect des colonies est pris en compte : taille, caractère rugueux ou lisse, pigmentées à l'obscurité ou après exposition à la lumière ou non pigmentées**. Tous ces caractères constituent des éléments d'orientation importants. A l'issue de cette première étape, le diagnostic s'oriente, soit vers une mycobactérie du complexe *tuberculosis*, soit vers une mycobactérie non tuberculeuse.

La mise en évidence de mycobactéries par **Polymérase Chain Reaction** permet de déceler en 24 heures la présence d'une mycobactérie appartenant au complexe *tuberculosis* dans un prélèvement, en amplifiant des séquences génomiques spécifiques.

4.3. Diagnostic

L'examen microscopique permet d'apprécier le degré de contamination par la salive. Il consiste à examiner soit à l'état frais, soit un frottis coloré, au microscope à grossissement et à dénombrer en faisant une moyenne sur 10 champs les cellules épithéliales et les leucocytes par champ.

Classe	Cellules par champ	
	Épithéliales	Leucocytes
1	> 25	< 10
2	> 25	10 - 25
3	> 25	> 25
4	10 - 25	> 25
5	< 10	> 25

Les expectorations de classe 1 et 2 sont fortement contaminées par la salive. Elles ne sont pas utilisables pour la culture. Un autre prélèvement est à demander. Les expectorations de classe 3 et 4 ont un nombre de leucocytes qui témoigne d'une réaction inflammatoire mais sont contaminées par la salive. Celles de classe 4 sont acceptables. **Les expectorations de classe 5 sont les plus appropriées pour l'examen bactériologique.**

Après fluidification du prélèvement on ensemence une dilution appropriée permettant un dénombrement des bactéries au delà de 10^5 UFC/mL sur gélose chocolat enrichie (incubation sous 5 à 10 % de CO_2), gélose au sang, gélose sélective pour les bacilles Gram -. Habituellement on se limite à l'identification et à l'antibiogramme d'une ou deux espèces bactériennes en quantité supérieure ou égale à 10^7 bactéries par mL.

Pneumopathies à germes opportunistes chez l'immunodéprimé :

La méthode de prélèvement de choix est le lavage broncho-alvéolaire. Les micro-organismes à rechercher sont : *Pneumocystis carinii*, *Toxoplasma gondii*, CMV, *M. tuberculosis*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*.

Pneumopathies atypiques :

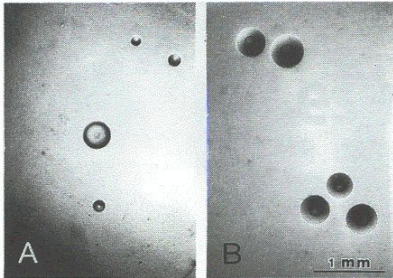
- Recherche de *Chlamydia psittaci* et *C. pneumoniae* préférentiellement à partir de l'écouvillonnage de l'oropharynx. Recherche de *Chlamydia trachomatis* dans les aspirations nasopharyngées ou la gorge.
- Recherche de *Mycoplasma pneumoniae*.
- Recherche de *Legionella* dans les sécrétions recueillies par brosse endo-bronchique ou lavage broncho-alvéolaire par culture sur BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) additionné d'antibiotiques. L'incubation se poursuit durant 10 jours avec une observation journalière à la loupe binoculaire. La **recherche de *Legionella* par amplification génique** est réalisée dans certains laboratoires principalement sur les LBA, de même que la **recherche précoce d'antigènes urinaires**.

Recherche de *Bordetella*

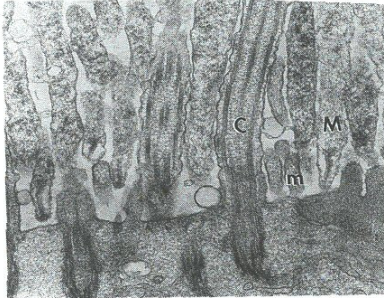
La majeure partie des cas de coqueluche observés en France le sont chez des enfants de moins de 2 ans ou chez des adultes anciennement vaccinés qui peuvent faire des formes atypiques de la maladie. Le prélèvement doit être le plus précoce possible, La culture est délicate, elle s'effectue sur milieu de Bordet et Gengou. La **réaction de polymérisation en chaîne (PCR)** est spécifique et sensible, mais elle n'est pas disponible en routine. La **recherche de l'adénylate cyclase** sécrétée par *B. pertussis* est une méthode qui a une bonne sensibilité, mais une spécificité moyenne.

LES MYCOPLASMES

Les mycoplasmes sont dépourvus de paroi : ils ne sont pas colorés par la méthode de Gram et ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques (bêtalactamines, rifampicine, polymyxine). Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés.



Colonies de *M. pneumoniae*. Notez leur petite taille et leur aspect en "oeuf sur le plat", surtout en B



Photographie en microscopie électronique à transmission, représentant l'anneau trachéal d'un hamster, infecté par *M. pneumoniae*. Notez l'orientation du mycoplasme grâce à un organite spécialisé en forme d'embout qui favorise le contact étroit avec l'épithélium respiratoire (grossissement x50.000). M, mycoplasme; m, microvillosité; et c, cils.

Ces bactéries sont également caractérisées par leur petite taille (<0,5 µm) et leur exigence en stéroïls. Elles sont fréquentes dans les environnements naturels et sont retrouvées régulièrement comme contaminants de cultures de cellules animales.

Mycoplasma pneumoniae se fixe sur l'épithélium respiratoire par l'intermédiaire d'une protéine d'attachement. L'infection est limitée à la muqueuse bordant les voies respiratoires : le mouvement des cils des cellules épithéliales est inhibé par les bactéries.

Mycoplasma pneumoniae

Infections respiratoires : trachéobronchites, pneumonies atypiques

Infections extra-respiratoires exceptionnellement : cutanées, articulaires, neurologiques, génitales, péricardiques

➔ Mycoplasmes génitaux *M. hominis* *U. urealyticum*

Infections masculines

urétrites	-	+
épididymites	-	+

Infections féminines

syndromes urétraux	-	±
vaginoses	±	-
cervicites	-	-
endométrites	+	+
salpingites	+	±

Infections néonatales

	+	+
--	---	---

Le diagnostic biologique d'une infection à *Mycoplasma pneumoniae* est plus souvent réalisé par la sérologie que par la culture ou la PCR. Ces dernières ont cependant l'avantage d'affirmer le caractère actuel de l'infection. Seule la culture est réalisée couramment pour les mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*.

Les milieux de culture sont complexes, rendus sélectifs par addition d'une bêta-lactamine ou de polymyxine. Il n'y a pas de milieu standard convenant à toutes les espèces, en raison de leurs exigences différentes en substrat et pH. La détection de la croissance, en milieux liquides, se fait d'après le virage d'indicateurs colorés (acidification en 6 à 20 jours pour *M. pneumoniae*, alcalinisation pour *M. hominis* et *U. urealyticum* en 18 à 48 h).

4.4. Traitement et prévention

Le dépend de l'agent causal. La recherche de bêta-lactamase est réalisée pour *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis*.



Dispersion des gouttelettes après un éternuement chez un patient atteint de rhume; on peut noter les filaments de mucus.

VIRUS RESPIRATOIRES : GRIPPES, BRONCHITE, RHUME...

DES GESTES SIMPLES POUR LIMITER LES RISQUES D'INFECTION

-  **LAVEZ-VOUS LES MAINS LE PLUS SOUVENT POSSIBLE AVEC DU SAVON PENDANT 30 SECONDES**
-  **JETEZ VOS MOUCHOIRS DANS UNE POUCELLE PUIS LAVEZ-VOUS LES MAINS**
-  **SI VOUS ÊTES MALADE, PORTEZ UN MASQUE* EN PRÉSENCE D'UNE AUTRE PERSONNE**

*MASQUE "CHIRURGICAL" (EN VENTE NOTAMMENT EN PHARMACIE)

ADOPTONS LES GESTES QUI NOUS PROTÈGENT

Institut National de Prévention et d'Éducation pour la Santé (inpes) | MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA FAMILLE ET DES SOLIDARITÉS | www.inpes.santé.fr | www.santé.gouv.fr



Bibliographie :

Microbiologie et pathologie infectieuse ; Moselio Schaechter, Gerald Medoff, Barry I. Eisenstein ; De Boeck Université.
REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr).

LES CHLAMYDIAE

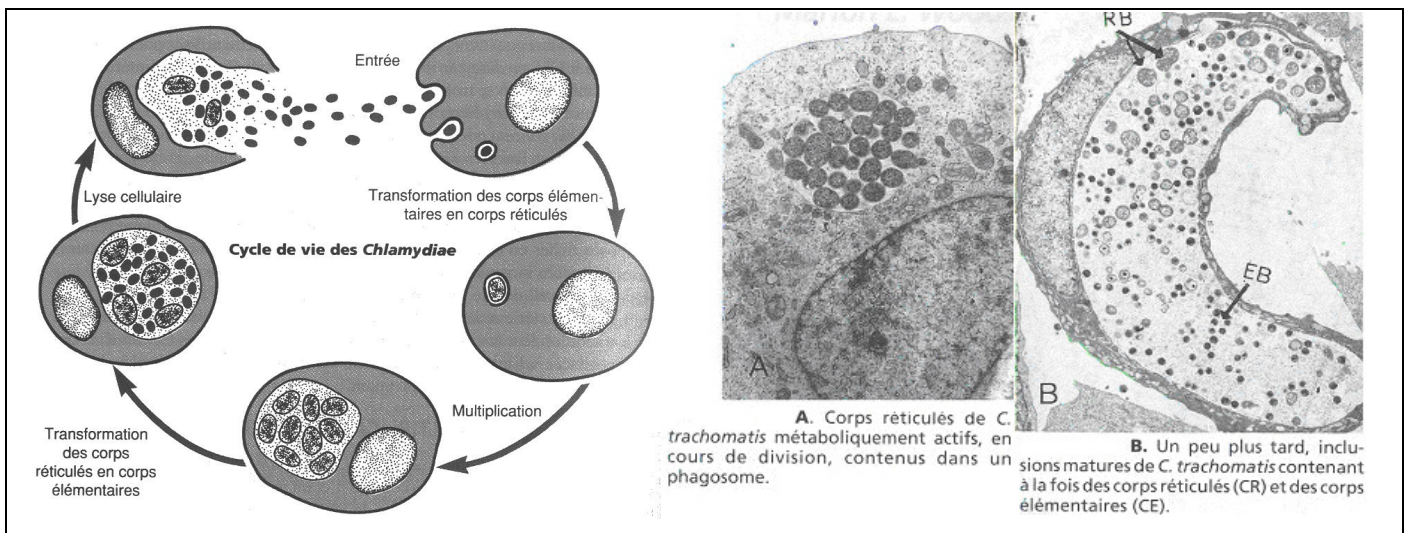
Les *Chlamydiae* sont responsables de maladies sexuellement transmissibles (cervicites, urétrites) dont les conséquences peuvent être graves (stérilité, grossesse extra-utérine). Ces bactéries provoquent également des infections oculaires (pouvant entraîner la cécité) et des pneumonies. Les *Chlamydiae* sont des **bactéries intracellulaires strictes** et ne peuvent pas être cultivés en milieu de culture acellulaire.

Au moins trois espèces sont responsables de maladies chez l'homme :

- *Chlamydia trachomatis* est elle-même divisée en trois types pathologiques :
 - Trachome non génital : sérovars A,B,C
 - Trachome génital et oculaire : sérovars D à K
 - Maladie de Nicolas et Favre (lymphogranulomatose vénérienne) : sérovars L1, L2, L3
- *Chlamydomphila pneumoniae*, agent de pneumonies sévères chez l'homme ;
- *Chlamydomphila psittaci* agent de la psittacose et de l'ornithose (infections respiratoires).

Leur cycle de multiplication comprend deux formes :

- le **corps élémentaire**, forme de transit d'une cellule à une autre, pénétrant dans les cellules épithéliales par **phagocytose dirigée** ;
- le **corps réticulé**, formé dans un phagosome de la cellule infectée et qui persiste car la bactérie s'oppose à l'union phagosome-lysosome. Les corps réticulés se multiplient puis se redifférencient en corps élémentaires avant de quitter la cellule hôte.



La mise en culture sur culture cellulaire étant une technique très lourde, le diagnostic direct peut être établi par **immunofluorescence** (avec un anticorps monoclonal marqué à la fluorescéine) ou par **PCR**.

Le diagnostic sérologique est possible mais son intérêt est limité en raison de communautés antigéniques et de la fréquence des infections, particulièrement respiratoires.

In vivo, peu d'antibiotiques sont actifs sur les *Chlamydiae* car ils doivent traverser la membrane de la cellule, la membrane de la vacuole et les membranes de la bactérie. Les molécules les plus actives sont les tétracyclines, les macrolides et apparentés et les fluoroquinolones. Une résistance naturelle est notée vis-à-vis des aminosides, de la colistine, du métronidazole, des quinolones de première génération et de la vancomycine.

5. Infections méningées

5.1. Signes cliniques

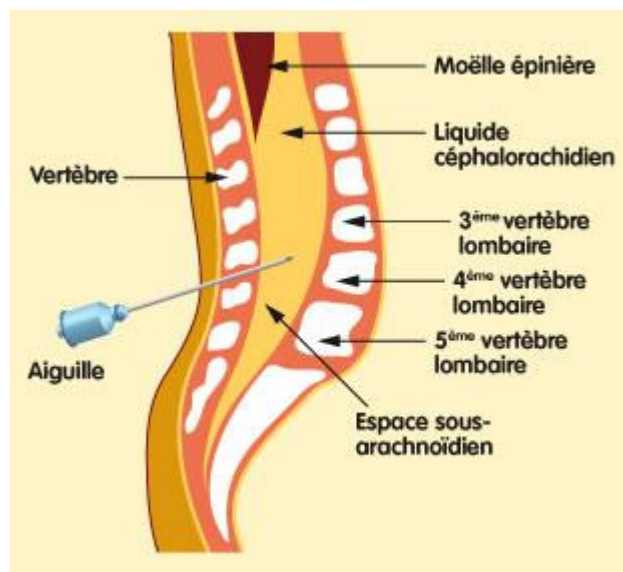
Les symptômes, lors des premières phases, sont similaires dans la méningite bactérienne et virale. Le syndrome méningé (ensemble de symptômes survenant au cours d'une méningite) caractérisant une méningite à liquide purulent comprend :

- une hyperthermie survenant rapidement,
- des maux de tête,
- des douleurs et une raideur de la colonne vertébrale,
- des photophobies (sensation pénible quand le patient regarde la lumière).

5.2. Prélèvement

La **ponction lombaire** est réalisée avec une asepsie rigoureuse. La quantité moyenne de LCR suffisante pour la majorité des examens à réaliser est de **3 ml**, recueillie dans 3 tubes stériles numérotés 1, 2, 3 servant respectivement à **l'examen biochimique, microbiologique et cytologique**.

Le patient est installé assis (ou parfois allongé sur le côté), le dos le plus rond possible afin de bien dégager le massif rachidien. Le point de ponction est repéré par le praticien : il doit se situer entre la 4^e et la 5^e, ou entre la 3^e et la 4^e vertèbre lombaire (qui correspondent à deux espaces intervertébraux où on ne risque pas de toucher la moelle épinière).



L'acheminement du LCR vers le laboratoire doit se faire sans délai (moins de 30 minutes) en raison de la lyse rapide des polynucléaires (jusqu'à 50 % en 2 heures), et à l'abri du froid en raison de la fragilité de certaines bactéries, notamment les **méningocoques**. Un minimum de renseignements cliniques (en particulier l'âge, la présomption diagnostique, les traitements antibiotiques antérieurement reçus par le malade), doit être transmis au laboratoire.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

Méningites communautaires

Adultes et enfants > 5 ans

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *Listeria monocytogenes*

Nourrissons et enfant < 5 ans

- *S. pneumoniae*
- *N. meningitidis*
- *H. influenzae*

Nouveau-né

- *Streptococcus agalactiae*
- *Escherichia coli*
- *Listeria monocytogenes*

Méningites neuro-chirurgicales

- *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* et apparentés

Méningite lymphocytaire de l'immunodéprimé (SIDA) : *Cryptococcus neoformans* (levure capsulée)

Une fois qu'un agent pathogène a atteint le cerveau, il se retrouve dans une région qui ne possède pas la multitude de moyens de défense de la plupart des régions de l'organisme. Par exemple, les taux de complément sont très bas dans le LCR, d'une part en raison d'une faible pénétration à partir de la circulation, mais d'autre part parce que le LCR contient une substance qui inactive partiellement le complément. Ainsi le processus de phagocytose a difficilement lieu dans le LCR, le cerveau ou les méninges. Néanmoins, le LCR n'est pas un milieu immunologiquement inactif, comme on le supposait. Il possède son propre système de surveillance immunologique dans la microglie. Les cellules de la microglie possèdent les mêmes marqueurs de surface que les monocytes du sang périphérique. Ceci permet de suggérer un processus de migration des monocytes vers le cerveau pour se différencier ensuite en microglie. De plus on considère maintenant que le SNC a une structure ressemblant au système lymphatique, grâce aux espaces de Virchow-Robin (une gaine autour des vaisseaux qui pénètrent dans le cerveau). Ces espaces contiennent des macrophages et des lymphocytes, on pense que c'est par là que ces cellules passent dans le SNC. L'existence de ces structures permet-elle de suggérer que les infections du SNC sont plus fréquentes qu'on ne le croit, mais la plupart du temps maîtrisées par les défenses de l'hôte?

Au cours des infections du SNC, plusieurs types de lésions tissulaires sont observées. La mort de la cellule de l'hôte peut être la conséquence directe de l'action des toxines bactériennes ou des cycles lytiques de la réplication virale, ou bien le résultat de la prolifération intracellulaire des bactéries ou des champignons. Dans de nombreuses infections, la mort cellulaire et la destruction tissulaire résulte d'une réaction inflammatoire de l'hôte lui-même. La multiplication et la dissémination des micro-organismes dans le SNC entraîne une réponse inflammatoire qui ressemble, même si elle est moins intense, à la réaction observée dans les autres parties de l'organisme. Cette réaction inflammatoire du SNC se caractérise par une infiltration de la microglie et une prolifération des astrocytes. Elle comprend une réponse humorale et une réponse cellulaire. La réponse humorale apparaît en premier et se traduit par un oedème secondaire à une augmentation de la perméabilité capillaire. Les neutrophiles et les macrophages infiltrent cette région, puis phagocytent les micro-organismes et les cellules mortes. Au cours de ce processus, on observe souvent une lyse des neutrophiles, libérant leur contenu enzymatique qui détruit les cellules et les tissus environnants.

5.3. Diagnostic

En raison de l'importance de la précocité du diagnostic et du traitement d'une méningite aiguë, toute suspicion de méningite doit faire **procéder sans délai à l'examen du LCR**. L'examen cytochimique du LCR permet de reconnaître ou de suspecter une **étiologie bactérienne justifiant un traitement antibiotique immédiat**.

Les milieux de culture permettant la croissance des bactéries les plus souvent responsables de méningites sontensemencés systématiquement d'urgence. Le LCR est classé en fonction de la cytochimie. Cela permet de reconnaître les catégories suivantes : LCR normal, purulent, lymphocytaire, panaché, hémorragique et d'orienter vers une étiologie bactérienne ou virale. Les examens macroscopique, cytologique et biochimique du LCR sont réalisés. Il est à noter que la formule leucocytaire est irréalizable en dessous de 10 éléments cellulaires par mm^3 et difficilement réalisable en dessous de 20.

LCR normal

- Aspect macroscopique : « eau de roche »
- Moins de 5 éléments/ mm^3
- Protéïnorachie et glycorachie normales.

La protéïnorachie est normalement inférieure à 0,4 g/l. La glycorachie est normalement supérieure à 60 % de la glycémie. Le dosage de la chlorurorachie, peu informatif, tend à être abandonné.

NB : chez le nouveau-né : 10 à 30 éléments / mm^3 (50 % de polynucléaires neutrophiles).

LCR panaché

- Plus de 10 éléments/ mm^3 ; égalité polynucléaires/lymphocytes.
- Protéïnorachie et glycorachie normales.

Ce peut être : une listériose, une méningite purulente ou une méningite lymphocytaire au début, un abcès cérébral.

LCR «purulent»

L'aspect macroscopique du LCR peut orienter d'emblée vers une méningite purulente lorsque le liquide est trouble ; ce caractère apparaît à partir de 200 globules blancs par mm^3 .

- Plus de 10 éléments/ mm^3 dont plus de 50 % de polynucléaires.
- Protéïnorachie > 0,40 g/l.
- Hypoglycorachie < 40 % de la glycémie.

La méningite est à considérer comme bactérienne.

LCR hémorragique

La contamination du LCR par des globules rouges fait discuter un traumatisme lors de la ponction lombaire ou une hémorragie sous-arachnoïdienne (associée à une pléiocytose et parfois une hypoglycorachie). La protéïnorachie devient alors difficilement interprétable puisque la présence de 1000 globules

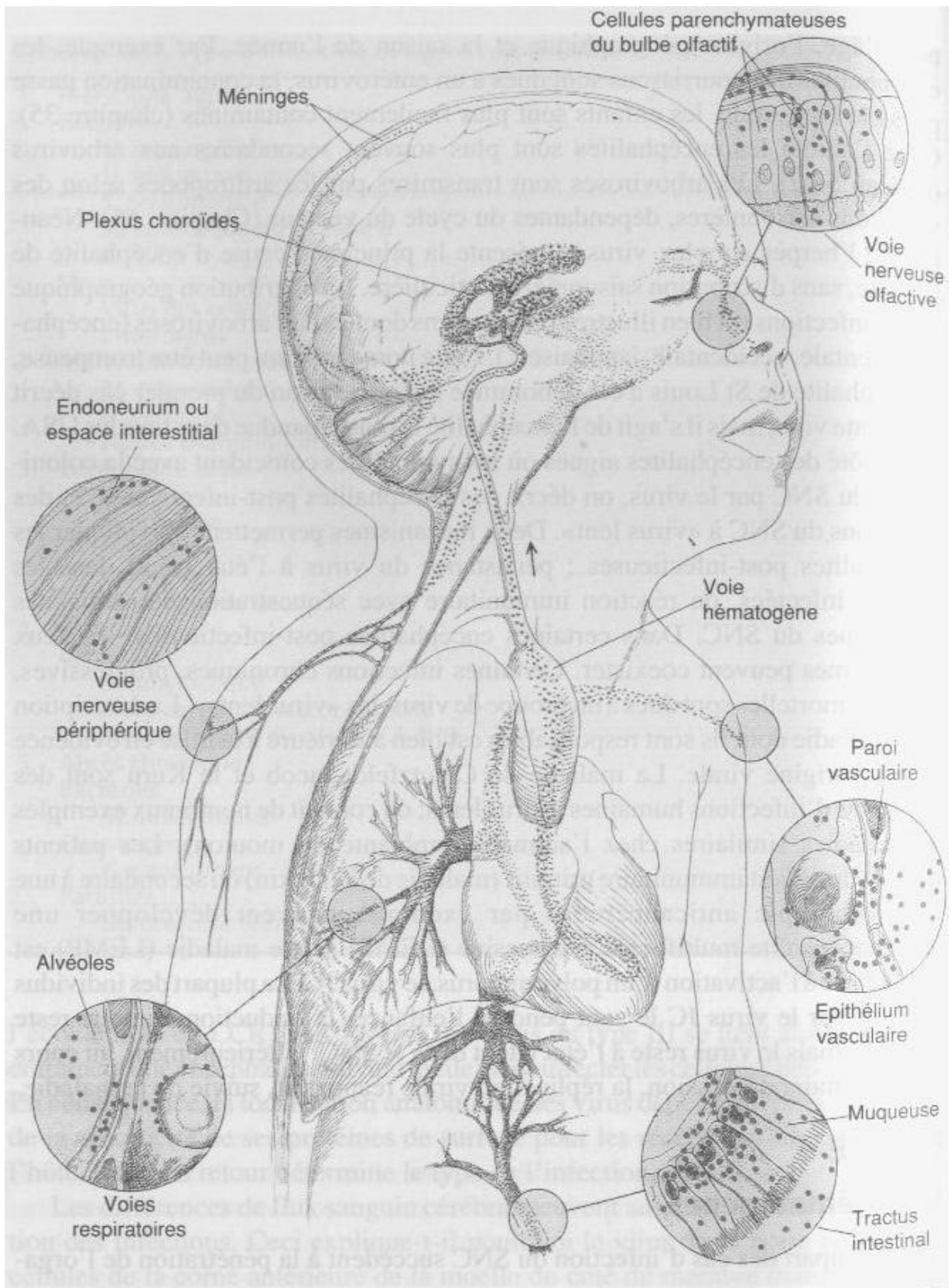
LCR lymphocytaire

- Plus de 10 éléments/ mm^3 dont plus de 50 % de lymphocytes.
- Protéïnorachie supérieure à 0,4 g/l.
- Si hypoglycorachie < 40 % de la glycémie : étiologie bactérienne probable (*Listeria*, BK accompagné d'une hypochlorurorachie).
- Si normoglycorachie > 50 % de la glycémie et moins de 100 éléments/ mm^3 : étiologie virale probable.

rouges augmente la protéïnorachie de 0,1 g/l. Une diminution progressive des globules rouges constatée sur un compte séquentiel des cellules dans 3 tubes de LCR est en faveur d'un traumatisme vasculaire lors du prélèvement.

L'orientation étiologique rapide est en fonction de la morphologie des microorganismes mis en évidence par l'examen microscopique après coloration de Gram. L'examen direct permet de préciser la présence ou l'absence de bactéries, leur aspect (cocci ou bacilles, Gram positif ou négatif), la **présence éventuelle d'une capsule***, la situation intra ou extra leucocytaire. La **détection d'antigènes solubles par technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées** est généralement utilisée. Les antigènes recherchés sont choisis en fonction de l'orientation diagnostique.

* L'examen à l'état frais en présence d'encre de chine permet de mettre en évidence de micro-organismes capsulés (*Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*).



Mode d'entrée des agents responsables d'infections du SNC. Dans les infections d'origine hématogène, les agents des voies respiratoires, de l'épithélium digestif pénètrent par les plexus choroïdes. Dans le SNC, ils disséminent ensuite soit par contiguïté, soit par l'espace extracellulaire. Certains virus neurotropes gagnent le cerveau suivant les nerfs périphériques ou les voies olfactives.

Dans tous les cas sont ensemencés des milieux permettant la croissance des bactéries exigeantes responsables de méningites purulentes :

- gélose au sang cuit, supplémentée en facteurs de croissance, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂ ;
- gélose au sang, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂ ;
- un milieu pour anaérobies incubé à 37°C en anaérobiose ;
- un bouillon à l'extrait globulaire (facultatif) permet de diluer les antibiotiques éventuellement présents dans le LCR.

Ces milieux sont observés après 18 h et 48 h d'incubation à 37°C et conservés 5 jours.

Selon les circonstances des milieux additionnels sont ensemencés :

- Méningite lymphocytaire chez un immunodéprimé (SIDA) : gélose de Sabouraud sans actidione ;
- Méningite lymphocytaire, hypoglycorachie, et suspicion de tuberculose : milieu de Löwenstein-Jensen (3 tubes ensemencés richement si possible) ou autre milieu spécifique.

5.4. Traitement et prévention

L'examen des colonies, le Gram, l'oxydase et la catalase permettent de préciser l'orientation diagnostique qui détermine le choix de la galerie d'identification à ensemencer, les **choix des techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques** et les méthodes de typage à mettre en œuvre :

- *H. influenzae* : rechercher une bêtalactamase ;
- *N. meningitidis* : rechercher une bêtalactamase (exceptionnelle) et une sensibilité diminuée à la pénicilline G par mesure du diamètre d'inhibition obtenu avec un disque d'oxacilline et détermination de la CMI ;
- *S. pneumoniae* : Détecter la résistance aux bêtalactamines à l'aide d'un disque d'oxacilline et détermination de la CMI de la pénicilline G, de l'amoxicilline et du céfotaxime ou ceftriaxone.

Pour que les agents antibactériens soient efficaces dans les méningites bactériennes, ils doivent être capables de pénétrer dans le LCR et doivent être bactéricides. Les antibiotiques bactériostatiques ne fonctionnent pas bien car l'infection a lieu dans un système virtuellement clos. Dans ce système, même des bactéries qui ne sont pas en croissance peuvent provoquer des dommages importants. Plusieurs classes d'antibiotiques sont bactéricides vis-à-vis de *H. influenzae* (pénicillines semi-synthétiques, céphalosporines, chloramphénicol, et même les aminosides). Le choix de l'antibiotique dépend de la sensibilité d'*H. influenzae* type b, et de sa capacité à pénétrer dans le LCR lorsqu'on administre des doses intra-veineuses standard.

Bibliographie :

Microbiologie et pathologie infectieuse ; Moselio Schaechter, Gerald Medoff, Barry I. Eisenstein ; De Boeck Université.
REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr) .

Le pathogène le plus important du genre *Haemophilus* est *H. influenzae*, que les anglosaxons nomment «H.flu.». Il a hérité son nom d'espèce d'une grande épidémie de grippe durant la première guerre mondiale. On l'a alors soupçonné d'être responsable de cette épidémie, et il fallut plus de douze ans pour se rendre compte que la grippe était causée par le virus de la grippe et que *H. influenzae* est, en fait, un envahisseur secondaire fréquent.

De nombreuses souches d'hémophiles sont entourées d'une capsule polysaccharidique qui est antiphagocytaire. On distingue six types antigéniques capsulaires qui peuvent être différenciés facilement à l'aide d'anticorps spécifiques. Dans le cas décrit au début du chapitre, la détection de l'antigène capsulaire spécifique a permis de poser un diagnostic presque instantanément. Le type b est responsable de presque tous les cas de méningites à *H. influenzae*. La capsule est formée de polymères de **ribose** et de **ribitol**, reliés par des ponts **phosphodiesters**. Il existe des souches d'*H. influenzae* non capsulées, responsables d'otites moyennes, de bronchites, et de pneumonies chez l'adulte.

On pense que plusieurs composants de *H. influenzae* jouent un rôle important pour accroître le pouvoir invasif des germes. Les souches de laboratoire qui n'ont pas ces composants sont moins virulentes vis-à-vis des modèles animaux. Le premier facteur de virulence semble être la **capsule**; les souches qui n'ont pas cette structure de surface sont incapables de provoquer une bactériémie, même quand on les inocule en intra-veineux. Les **pili**, le **lipopolysaccharide** (LPS, endotoxine), et certaines **protéines de la membrane externe** (telles que celles qui facilitent l'acquisition du fer) sont nécessaires pour que la souche soit complètement virulente. Les pili et le LPS sont sujets à des variations antigéniques et à des modulations en fonction de l'environnement. Cependant, le rôle que ces structures jouent dans la pathogénie, n'est toujours pas élucidé.

Les méningocoques sont entourés d'une grosse capsule qui leur permet de résister aux mécanismes de défense de l'hôte. Ils peuvent se multiplier de façon importante dans le sang. Les méningocoques libèrent de grosses quantités de substances provenant de la membrane externe sous forme de vésicules membranaires contenant du lipopolysaccharide (endotoxine). Ce lipopolysaccharide/endotoxine induit la production et la libération dans le sang de médiateurs biologiques puissants, tels que le tumor necrosis factor (TNF), qui est responsable des signes systémiques de la méningococcémie, de la coagulation intravasculaire disséminée, et du choc. Les méningocoques ont aussi une prédisposition pour le système nerveux central (SNC) entraînant comme complication la «méningite cérébrospinale» si redoutée.

Une fois dans le sang, le méningocoque se multiplie extrêmement rapidement, atteignant des quantités qui sont parmi les plus élevées qu'une bactérie puisse atteindre. Il est possible, par exemple, d'observer les bactéries directement sur un frottis de leucocytes, ce qui est rarement vu dans d'autres septicémies bactériennes.

La pénétration des méningocoques dans le sang peut provoquer une maladie fulgurante, le **purpura fulminans** dont l'origine est une CIVD avec des manifestations cutanées (**pétéchies** et **ecchymoses**), une **méningite**, un **choc** et la **mort**. La CIVD est accompagnée de choc, de fièvre, et d'autres réponses à l'endotoxine médiées par le tumor necrosis factor (TNF) et par l'interleukine-1 (IL-1). Ces signes systémiques sont donc la conséquence directe de la capacité du méningocoque à survivre et se multiplier dans le sang. La maladie méningococcique peut être efficacement prévenue par un vaccin à base de polysaccharides capsulaires. Il faut noter que la capsule des souches de méningocoques du groupe B contient un polymère d'acide sialique non immunogène, n'induisant pas la synthèse d'anticorps protecteurs.

6. Infections cutanées et suppurations

6.1. Signes cliniques

Les prélèvements parmi les plus examinés en bactériologie sont les produits de suppurations d'origines diverses. On distingue habituellement les suppurations primitives (anthrax, furoncle) et les suppurations secondaires dues à manœuvres chirurgicales (surinfections à bactéries opportunistes), à des traumatismes...

6.2. Prélèvement

Produit	Mode de prélèvement	Commentaire
Plaie superficielle, brûlure, abcès ouvert, ulcère, ulcération, escarre, lésions cutanées nécrotiques	<ul style="list-style-type: none">• Nettoyer la plaie, éliminer les exsudats, débri-der les tissus nécrosés si nécessaire• Appliquer de la Bétadine® et laisser sécher• Rincer à l'eau physiologique stérile• Biopsier la lésion ou cureter le bord actif de la lésion (voir biopsies)• Eventuellement aspirer à l'aiguille fine le liquide inflammatoire produit par la lésion (très peu de matériel est suffisant). Si nécessaire, aspirer ensuite 1 ml d'eau physiologique stérile pour éviter que le prélèvement ne se dessèche dans la seringue• Écouvillonnage peu fiable, à la rigueur frottis fermement appuyé	Culture anaérobie inutile. Un prélèvement de plaie réalisé selon les modalités ci-contre n'est indiqué que s'il y a des signes d'accompagnement locaux (douleur, inflammation péri-ulcéreuse) ou généraux (adénite, fièvre)
Prélèvements réalisés au cours d'opération sur matériel implanté ou sur lésion osseuse	Effectuer plusieurs prélèvements (écouvillonnages ou biopsies) en des sites anatomiques différents (régions osseuses diverses, matériel implanté, ciment...) et bien les identifier sur la demande d'examen.	Les lésions osseuses et les bio-matériaux peuvent être contaminés par des germes provenant de l'environnement ou de la peau. Comme pour les hémocultures, la mise en évidence d'une infection par un germe habituellement considéré comme peu pathogène (<i>Bacillus</i> , staphylocoque à coagulase négative) nécessite d'avoir isolé plusieurs fois la bactérie

6.3. Diagnostic

Examen direct : une coloration de Gram est indispensable. Il faut indiquer le nombre relatif de leucocytes et la présence de cellules épithéliales (indiquant une contamination de surface), ainsi que l'abondance relative des différents types de bactéries.

Cultures : au minimum pour les prélèvements superficiels, on ensemence une gélose au sang, un milieu sélectif pour les bacilles à Gram négatif. Si l'échantillon est sous forme d'écouvillon, on le décharge dans 0,5 ml de bouillon et on isole. Pour les morsures, il est nécessaire d'incuber une gélose au sang sous CO₂ (10%) durant 4 à 5 jours et une gélose au sang en anaérobiose.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

1- Plaies traumatiques aiguës

- ◆ Elles sont habituellement surinfectées par les bactéries pyogènes.
- ◆ Morsures d'animaux : on recherchera les bactéries des morsures *Pasteurella* et apparentés, les anaérobies strictes, *Streptobacillus moniliformis* (rongeurs).
- ◆ Morsures humaines : *Eikenella corrodens*, anaérobies.
- ◆ Plaies traumatiques contaminées par la terre, rechercher les *Clostridium*; contaminées par les eaux douces : *Aeromonas* spp, *Pseudomonas* spp; par les eaux de mer : *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio vulnificus*.
- ◆ Plaies traumatiques gangréneuses : *Clostridium* spp., (*Aeromonas*)
- ◆ Brûlures : *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* (*Aeromonas* si aspersion de brûlures par des eaux contaminées).

2- Plaies chirurgicales

Elles sont initialement stériles puis peuvent être secondairement contaminées par la flore du site ou du service hospitalier. Ce sont le plus souvent des surinfections d'origine hospitalière (staphylocoques, Entérobactéries et bacilles à Gram négatif divers, *Enterococcus* spp.).

3- Plaies cutanées chroniques

Ces plaies et escarres survenant sur un terrain débilisé chez les alités, vont être contaminées et envahies par une flore polymorphe d'origine cutanée voire digestive (corynébactéries, entérobactéries diverses dont *Proteus*, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*).

4- Suppurations des voies biliaires

La bile est normalement stérile. Dans une infection primitive (cholécystite) et dans les surinfections post chirurgicales, on pourra isoler : *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., éventuellement des anaérobies.

5- Suppurations nosocomiales

Les bactéries possibles sont très diverses :

- *Staphylococcus aureus* méti R
- *Pseudomonas aeruginosa* et autres *Pseudomonas* spp.
- *Escherichia coli*, *Klebsiella*
- *Enterobacter*, *Serratia* et autres *Enterobacteriaceae*
- *Acinetobacter*
- *Alcaligenes faecalis* et *Alcaligenes* spp.
- *Stenotrophomonas maltophilia*
- *Chryseobacterium meningosepticum*
- *Corynebacterium jeikeium* et autres *Corynebacterium* spp

6- Ostéites (post-chirurgicales)

- *Staphylococcus aureus* multirésistants
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Streptococcus* spp.
- *Enterobacteriaceae* multirésistantes
- Flore plurimicrobienne aérobie et anaérobie

Bibliographie :

REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr) .

7. Septicémies

7.1. Signes cliniques

Le sang est normalement stérile. Un état septicémique se caractérise par un passage répété de microorganismes dans le sang. Toute fièvre d'origine indéterminée, surtout si elle est accompagnée de signes cliniques évocateurs d'infection, doit donner lieu à la pratique d'hémocultures.

Prédiction de la bactériémie d'après Bates ►

Facteur de prédiction	Points
Température maximale > 38°3 C	3
Maladie rapidement fatale	4
Maladie terminale	2
Présence de frissons	3
Toxicomanie par voie veineuse	4
Abdomen chirurgical	3
Facteur de comorbidité majeur ^a	3

a Coma ou mort cérébrale, perforation digestive, multi-traumatisé ou brûlé, arrêt cardio-respiratoire dans les 24 heures, pancréatite aiguë, détresse respiratoire, insuffisance hépatique aiguë ou chronique

Score ≥ 6 : fort risque de bactériémie
score ≤ 2 : faible risque

7.2. Prélèvement

► Eviter les contaminants et travailler en sécurité

- L'antisepsie de la peau doit se faire successivement avec de l'alcool à 70 % puis un produit iodé, teinture d'iode ou polyvidone iodée. Une à deux minutes de contact sont nécessaires pour obtenir l'effet antiseptique maximal de la polyvidone iodée. L'activité bactéricide de la teinture d'iode est plus rapide que celle de la polyvidone iodée. Après la ponction veineuse le produit iodé potentiellement irritant est enlevé avec de l'alcool à 70 %.
- La désinfection du capuchon du flacon d'hémoculture est réalisé avec de l'alcool à 70 % ou un produit iodé que l'on laisse sécher avant usage.
- La ponction veineuse est la seule méthode fiable pour prélever du sang en vue de la culture. Les autres sites de prélèvement notamment les recueils de sang par cathéter augmentent de façon significative la fréquence des contaminants.
- La pratique des prélèvements pour hémoculture expose le préleveur à des risques liés au sang du malade. La transmission des virus des hépatites, en particulier hépatite C (VHC) est le risque le plus important avant le VIH.

► Prélever une quantité de sang suffisante

La densité des bactéries présentes dans le sang est généralement très faible chez l'adulte. Une quantification faite par centrifugation-lyse (Isolator) au cours de bactériémies significatives a montré que la densité bactérienne était inférieure à 1 UFC/ml dans des pourcentages importants d'épisodes. Il existe une relation directe entre le volume de sang inoculé dans les flacons d'hémoculture et le rendement de la technique. Un volume de 20 ml de sang prélevé augmente le pourcentage de positivité de 30%, comparativement à un volume de 10 ml qui est le minimum souhaitable chez l'adulte. De la même façon l'augmentation du volume de sang inoculé dans les flacons augmente la sensibilité de la détection de la positivité par un automate.

Chez l'enfant, la densité des bactéries dans le sang est plus importante que chez l'adulte. Ainsi, un prélèvement de 1 à 2 ml est considéré comme satisfaisant. Ce volume peut être accru en fonction de l'âge.

► Effectuer le nombre de prélèvements nécessaires

Si l'on excepte les infections du système vasculaire, particulièrement les endocardites bactériennes, au cours desquelles la bactériémie est permanente, au cours des autres situations cliniques, la bactériémie peut être soit transitoire, soit intermittente.

Plusieurs auteurs ont analysé le nombre d'hémocultures nécessaires pour détecter la totalité des épisodes bactériémiques.

Il faut en conclure que 3 ou même 2 hémocultures par 24 heures sont suffisantes pour isoler la totalité des bactéries ou des levures responsables d'épisodes bactériémiques.

Un espace de temps de 30 à 60 minutes entre deux prélèvements de sang a été recommandé.

7.3. Diagnostic

Il est classique pour une même hémoculture d'ensemencer un jeu de **deux flacons, l'un incubé en aérobiose, l'autre en anaérobiose**. Le sang des malades contient de nombreuses substances à activité antibactérienne : complément, lysozyme, cellules phagocytaires et des antibiotiques dans environ un tiers des cas. La dilution du sang dans le bouillon atténue l'effet de ces substances. La **dilution au 1/10** est celle qui donne le meilleur résultat.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

Les données épidémiologiques montrent que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont les deux espèces les plus souvent isolées en situation de pathogénicité. La fréquence d'isolement des **Staphylocoques à coagulase négative (SCN)** s'est accrue considérablement au cours des deux dernières décennies, mais **seulement 10 à 20 % de ces isolats ont une signification clinique. La majorité des SCN isolés par hémoculture sont des contaminants, ce qui pose parfois des problèmes difficiles d'interprétation.**

D'autres micro-organismes ont vu leur fréquence d'isolement par hémocultures s'accroître : *Enterococcus*, *Levures*, *Mycobactéries*. En revanche, **la fréquence d'isolement des bactéries anaérobies reste faible** notamment chez les enfants.

Pour attribuer une signification clinique à une hémoculture il est dangereux de se baser sur le fait que les deux flacons (aérobie et anaérobie) ou seulement l'un des flacons est positif. En pratique, la signification clinique d'un microorganisme isolé par hémoculture est d'autant plus probable qu'il sera retrouvé dans des prélèvements successifs.

La variété des micro-organismes pouvant être trouvés dans le sang s'est accrue à mesure que la proportion de malades immunodéprimés augmentait. Les espèces en cause sont nombreuses et ont des exigences nutritives variées qui font que le milieu de culture universel n'existe pas.

Les découvertes microbiologiques du siècle passé nous ont aussi permis d'expliquer pourquoi les patients atteints de blessures septiques peuvent devenir si malades ; les micro-organismes peuvent essemmer, d'abord par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques (ce qui correspond aux stries rouges sur l'avant bras de Monsieur L.) et ensuite via le torrent circulatoire, conduisant à un «sang septique» ou **septicémie** ou même à un sang purulent ou «pyémie»; ce que nous appelons aujourd'hui une leucocytose. Est-ce que le patient est malade à cause des effets des micro-organismes dans le sang lui-même (ou comme cela était considéré, à cause de ses toxines) ou, est-ce que le sang sert de vecteur aux toxines microbiennes en direction des tissus ? ceci est un sujet de considérable controverse ; ce qui est clair en tous cas, c'est qu'un processus localisé est devenu systémique.

Très tôt, il a été considéré que des bactéries vivantes pouvaient être présentes dans le sang sans pour autant que le patient soit très malade (**bactériémie**). D'un autre côté, lorsqu'une infection systémique grave est présente, une bactériémie est régulièrement retrouvée; ainsi les patients septicémiques sont par définition bactériémiques. Alors, qu'est-ce qu'un **sepsis** ? Jusqu'à assez récemment, le sepsis et la septicémie étaient à peu près synonymes, et c'est encore le cas dans de nombreux ouvrages. Cependant, dans les vingt dernières années, les idées concernant les rapports entre la septicémie et le sepsis ont évolué dans deux axes.

Le **polyanéthol sulfonate de sodium** (SPS) est l'**anticoagulant** très généralement utilisé dans les bouillons pour hémoculture à une concentration de 0,025 à 0,05 %. Le SPS favorise la croissance de la plupart des bactéries car il inhibe l'activité bactéricide du sérum, il inhibe la phagocytose, il inactive le complément, neutralise le lysozyme et les antibiotiques de la famille des aminosides. Néanmoins, le SPS peut avoir un effet inhibiteur sur certaines souches de *Neisseria*. Une mesure utile est de réaliser les prélèvements pour hémocultures à distance de l'administration des antibiotiques.

Une **incubation à l'étuve à 35°C pendant 7 jours** est suffisante en routine. Avec les automates une durée de 5 jours a été validée. Au delà de ce délai les bactéries détectées sont généralement des contaminants qui étaient présents en faible quantité dans le prélèvement. Un temps d'incubation plus long peut toutefois être nécessaire pour des micro-organismes particuliers (champignons, *Haemophilus*, *Legionella*...)

Chaque jour ou mieux **deux fois par jour, les flacons sont inspectés en vue de rechercher des signes témoignant d'une croissance visible**. Il est à signaler que certaines bactéries comme les *Neisseria*, les *Haemophilus* et les *Campylobacter* troublent peu ou pas le bouillon de culture et que l'usage d'un **flacon diphasique** s'avère utile pour ces espèces. Les systèmes diphasiques permettent la **croissance précoce de colonies sur le milieu gélosé**. Ceci est intéressant pour les espèces bactériennes à croissance délicate.

7.4. Investigations spécifiques

Recherche de mycobactéries

Mycobacterium avium-intracellulare (complexe MAC) est la mycobactérie la plus fréquemment rencontrée au cours du Sida. Le diagnostic de l'infection repose sur la mise en évidence de la bactérie par hémocultures ou accessoirement dans la moelle osseuse ou des prélèvements biopsiques. D'autres mycobactéries, plus rares, *M. kansasii* ou *M. tuberculosis* peuvent être isolées d'hémocultures dans ce contexte.

Brucella - Certaines souches sont exigeantes en CO₂. Le sang est inoculé en flacon diphasique type Castaneda, incubé 6 semaines à 37°C. Les subcultures se feront sur gélose Trypticase Soja additionnée de 5% de sérum de boeuf ou sur *Brucella* agar- incubée en atmosphère de 5 % de CO₂.

Campylobacter - Culture à 37°C en micro-aérophilie dans une atmosphère de 5 % de CO₂ sur milieu de Skirrow, Butzler ou Karmali incubés 72 heures.

Mycoplasme - Ureaplasma - Culture en bouillon PPLO ou gélose A3 incubé en micro-aérophilie à 37°C et observé 3 jours.

Leptospira - Recueil du sang sur tube hépariné et ensemencement en tubes de milieu Tween-Albumine ou EMJH incubés à 30°C à l'obscurité. Observation hebdomadaire des cultures au microscope à fond noir pendant deux mois.

Groupe HACEK - *Haemophilus aphrophilus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* et *Kingella kingae* sont des espèces responsables d'endocardites bactériennes qui se développent lentement. Elles peuvent nécessiter une incubation des flacons d'au moins 14 jours, ce qui est supérieur à la durée usuelle de l'incubation des flacons placés dans un automate.

Legionella - Culture sur milieu BCYE incubé à 37°C en atmosphère enrichie de 5% de CO₂. Observation pendant 10 jours.

Streptocoques déficients (Abiotrophia) - Certaines souches de streptocoques du groupe viridans exigent du pyridoxal pour leur croissance. Ces souches peuvent être trouvées comme responsables de bactériémies ou d'endocardites. Elles se caractérisent par une croissance en bouillon et une absence de croissance en milieu gélosé. Le besoin en pyridoxal est mis en évidence par la croissance sur gélose au sang additionnée de 0,001 % de pyridoxal ou par un test de satellitisme autour d'une strie de *S. aureus*.

Levures et moisissures

Les champignons sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Les facteurs de prédisposition des patients concernés sont : l'immunodépression, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, de cathéters veineux centraux, en particulier pour l'administration de solutions d'hyperalimentation. Les résultats récents indiquent que la détection des fongémies constituent un des examens-clés du diagnostic des mycoses invasives, comme les candidoses.

Bibliographie :

Microbiologie et pathologie infectieuse ; Moselio Schaechter, Gerald Medoff, Barry I. Eisenstein ; De Boeck Université.
REMIC (Référentiel en microbiologie médicale) ; Edition 2m2 (www.2m2.fr) .

**Orientation présumptive
de la bactérie responsable en fonction
de l'aspect du flacon d'hémoculture**

Signe observé	Bactérie en cause
Turbidité	Bacilles à Gram négatif aérobies Staphylocoque, <i>Bacteroides</i>
Hémolyse	Streptocoque, Staphylocoque <i>Listeria</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i>
Production de gaz	Bacilles à Gram négatif aérobies anaérobies
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>



Automates :

Type	Principe de détection	Nbre de lecture quotidienne	Volume de bouillon par flacon
Bactec 9240	mesure non invasive de CO ₂ par fluorescence	toutes les 10 mn	25 ml
Vital	mesure de variation CO ₂ - H ₂ et/ou pH par fluorescence	toutes les 15 mn	40 ml
BacT/Alert	mesure du CO ₂ par «sensor» indicateur de pH	toutes les 10 mn	40 ml
Bio Argos	mesure du CO ₂ par infra-rouge à travers le verre	programmé 8 à 2	25 ml

Au cours des **endocardites infectieuses**, si les **hémocultures sont négatives après 3 jours d'incubation**, il est recommandé de faire les examens sérologiques suivants :

- *Chlamydia psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* ;
- *Brucella* ;
- *Legionella* ;
- *Mycoplasma pneumoniae* ;
- *Candida* (voire selon le contexte *Aspergillus*, *Histoplasma*).

Pour la détection des anticorps vis à vis de *Candida* ou *Aspergillus* il est recommandé d'utiliser deux techniques utilisant des principes différents : une technique de précipitation (électrosynérèse, immuno-électrophorèse) et une technique de type IF ou ELISA. Par ailleurs, la détection d'antigène circulant par méthode immunologique est réalisée par certains laboratoires.

8. Infections génitales

8.1. Signes cliniques

L'étude des prélèvements de sécrétions et exsudats génitaux ou ano-génitaux est réalisée au laboratoire de bactériologie pour la détection des micro-organismes responsables :

- **chez la femme** : des cervicites, vulvo-vaginites, urétrites, salpingites, endométrites, anites, des ulcères ano-génitaux, des infections des glandes de Bartholin ou, en fin de grossesse, d'un portage d'une bactérie potentiellement pathogène pour la mère et l'enfant avant ou au moment de l'accouchement ;
- **chez l'homme** : des urétrites, épидидymites, prostatites, anites, ou des ulcères ano-génitaux.
- Dans les deux sexes, lors de l'exploration d'une hypofertilité.

Un grand nombre de ces infections sont des **maladies sexuellement transmissibles**, et nécessitent donc l'examen du ou des partenaires sexuels.

8.2. Prélèvement

Les prélèvements effectués au laboratoire, par le biologiste, permettent de noter l'aspect des lésions et de la leucorrhée (en particulier l'aspect et l'odeur évocateurs d'une vaginose ou d'une candidose).

↳ Ulcérations

L'examen extemporané, au microscope à fond noir, de la sérosité du chancre permet la mise en évidence de *Treponema pallidum*. On peut également faire appel à l'immunofluorescence directe, à l'imprégnation argentine ou à la coloration de Vago.

La coloration de May-Grunwald-Giemsa de frottis réalisés avec la sérosité d'un chancre mou ou du pus du bubon mettra en évidence des bacilles évoquant *Haemophilus ducreyi*, en sachant que cette bactérie est peu colorable au Gram.

Il ne faut pas oublier la possibilité d'exulcérations, de type herpétique, en rapport avec une infection à *Chlamydia* (maladie de Nicolas-Favre) ou *Mycoplasma* (voir ci-dessous).

On pourra exceptionnellement mettre en évidence des corps de Donovan (*Calymmatobacterium granulomatis* ou *donovani*) dans un granulome inguinal survenu 2 à 3 mois après un rapport contaminant.

↳ Urétrites, cervicites et vaginites

Les trois causes les plus fréquentes des vaginites sont *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* et les bactéries des vaginoses. On recherche systématiquement *N. gonorrhoeae*, et on ajoute la recherche de *Chlamydia trachomatis* dans les urétrites et cervicites.

Il est important de savoir que *Candida albicans* peut exister chez des femmes totalement asymptomatiques.

L'examen macroscopique, la couleur, l'odeur, le pH des sécrétions vaginales sont un élément important du diagnostic, en particulier des vaginoses qui associent sécrétions grisâtres, odeur d'amines de poisson (test à la potasse 10 %) et pH > 4,5.

L'état frais, entre lame et lamelle recherchera la présence de *Trichomonas vaginalis* ou de *Candida albicans* (ce dernier est mieux mis en évidence après dilution dans la potasse à 10 % et au contraste de phase).

Les colorations de May-Grunwald-Giemsa, et éventuellement de Papanicolaou, permettent l'étude cytologique indispensable : présence de polynucléaires, de cellules vaginales, de «clue-cells» des vaginoses, de *Trichomonas vaginalis*, et plus rarement mise en évidence des cellules à inclusion de l'infection à *Chlamydia trachomatis*.

La coloration de Gram permet le diagnostic de gonorrhée, de candidose à *Candida albicans* et surtout d'étudier la flore bactérienne vaginale et son équilibre qui peut être décrit par un **score de I à IV** (score I = flore équilibrée, score IV = flore complètement substituée).

Dans la **vaginose bactérienne**, on observe un déséquilibre de la flore commensale au profit des anaérobies ou de *Gardnerella vaginalis* au dépend de la flore de Döderlein (lactobacilles) : score III ou IV. En pratique l'examen direct permet le diagnostic de vaginose étant donné la difficulté, le coût et les délais de la mise en culture des bactéries.

Etiologies et mécanismes physiopathologiques

Les **infections sexuellement transmissibles** (IST) se transmettent la plupart du temps lors d'un rapport sexuel. **Il existe plus de trente bactéries, virus et parasites sexuellement transmissibles.** Plusieurs, dont le VIH et la syphilis, se transmettent aussi de la mère à l'enfant pendant la grossesse et à l'accouchement, et par les transfusions sanguines et les greffes.

Infections bactériennes courantes :

- *Neisseria gonorrhoeae* (responsable de la gonorrhée ou de l'infection à gonocoque) ;
- *Gardnerella vaginalis* (responsable de la vaginose) ;
- *Chlamydia trachomatis* ;
- *Treponema pallidum* (responsable de la syphilis) ;
- *Haemophilus ducreyi* (responsable du chancre mou).

Infections virales courantes :

- Virus de l'immunodéficience humaine (responsable du sida) ;
- Virus Herpes simplex type 2 (responsable de l'herpès génital) ;
- Papillomavirus humain (responsable de condylomes et du cancer du col de l'utérus) ;
- Virus de l'hépatite B (responsable de l'hépatite et de cancers hépatiques) ;
- Cytomégalovirus (responsable d'inflammations de divers organes).

Autres :

- *Trichomonas vaginalis* (protozoaire responsable de la trichomonase vaginale);
- *Candida albicans* (levure responsable de la vulvo-vaginite chez la femme, de la balanite chez l'homme).

Micro-organismes toujours pathogènes	Micro-organismes commensaux éventuellement pathogènes	Micro-organismes sans pouvoir pathogène connu
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Mobiluncus spp</i>	<i>Neisseria</i> autres que <i>gonorrhoeae</i>
Herpès virus	<i>Mycoplasma, Ureaplasma</i>	Staphylocoques non <i>aureus</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	<i>Streptococcus spp</i>	
	Anaérobies strictes	
	Entérobactéries	
	Papillomavirus	

8.3. Diagnostic

L'examen cytobactériologique direct des prélèvements est fonction du contexte clinique.

↳ Ulcérations

L'examen extemporané, au microscope à fond noir, de la sérosité du chancre permet la mise en évidence de *Treponema pallidum*. On peut également faire appel à l'immunofluorescence directe, à l'imprégnation argentine ou à la coloration de Vago.

La coloration de May-Grunwald-Giemsa de frottis réalisés avec la sérosité d'un chancre mou ou du pus du bubon mettra en évidence des bacilles évoquant *Haemophilus ducreyi*, en sachant que cette bactérie est peu colorable au Gram.

Il ne faut pas oublier la possibilité d'exulcérations, de type herpétique, en rapport avec une infection à *Chlamydia* (maladie de Nicolas-Favre) ou *Mycoplasma* (voir ci-dessous).

On pourra exceptionnellement mettre en évidence des corps de Donovan (*Calymmatobacterium granulomatis* ou *donovani*) dans un granulome inguinal survenu 2 à 3 mois après un rapport contaminant.

↳ Urétrites, cervicites et vaginites

Les trois causes les plus fréquentes des vaginites sont *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* et les bactéries des vaginoses. On recherche systématiquement *N. gonorrhoeae*, et on ajoute la recherche de *Chlamydia trachomatis* dans les urétrites et cervicites.

Il est important de savoir que *Candida albicans* peut exister chez des femmes totalement asymptomatiques.

L'examen macroscopique, la couleur, l'odeur, le pH des sécrétions vaginales sont un élément important du diagnostic, en particulier des vaginoses qui associent sécrétions grisâtres, odeur d'amines de poisson (test à la potasse 10 %) et pH > 4,5.

L'état frais, entre lame et lamelle recherchera la présence de *Trichomonas vaginalis* ou de *Candida albicans* (ce dernier est mieux mis en évidence après dilution dans la potasse à 10 % et au contraste de phase).

Les colorations de May-Grunwald-Giemsa, et éventuellement de Papanicolaou, permettent l'étude cytologique indispensable : présence de polynucléaires, de cellules vaginales, de «clue-cells» des vaginoses, de *Trichomonas vaginalis*, et plus rarement mise en évidence des cellules à inclusion de l'infection à *Chlamydia trachomatis*.

La coloration de Gram permet le diagnostic de gonorrhée, de candidose à *Candida albicans* et surtout d'étudier la flore bactérienne vaginale et son équilibre qui peut être décrit par un score de I à IV (score I = flore équilibrée, score IV = flore complètement substituée, cf tableau 2).

Dans la vaginose bactérienne, on observe un déséquilibre de la flore commensale au profit des anaérobies ou de *Gardnerella vaginalis* au dépend de la flore de Döderlein (lactobacilles) : score III ou IV. En pratique l'examen direct permet le diagnostic de vaginose étant donné la difficulté, le coût et les délais de la mise en culture des bactéries.

La culture est impossible pour *Treponema pallidum*, très difficile pour *Haemophilus ducreyi* (sur gélose au sang cuit ou frais enrichie). Les prélèvements serontensemencés au minimum sur :

- gélose au sang cuit avec et sans mélange inhibiteur (type VCN ou VCAT) pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* incubée en atmosphère à 10 % de CO₂ ;
- gélose au sang (base Columbia) ± ANC pour la recherche de diverses bactéries à Gram positif, dont *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* ;
- une gélose lactosée est utile pour la recherche de divers bacilles à Gram négatif, en particulier les entérobactéries qui ne seront prises en considération, dans les urétrites et vaginites, que si elles sont abondantes, en l'absence d'autres germes.

L'isolement de *Gardnerella vaginalis* sur gélose au sang humain n'a de signification qu'accompagné d'une appréciation semi-quantitative. *Gardnerella* n'est pas le seul germe impliqué dans les vaginoses (association avec des bactéries anaérobies, *Mobiluncus* spp).

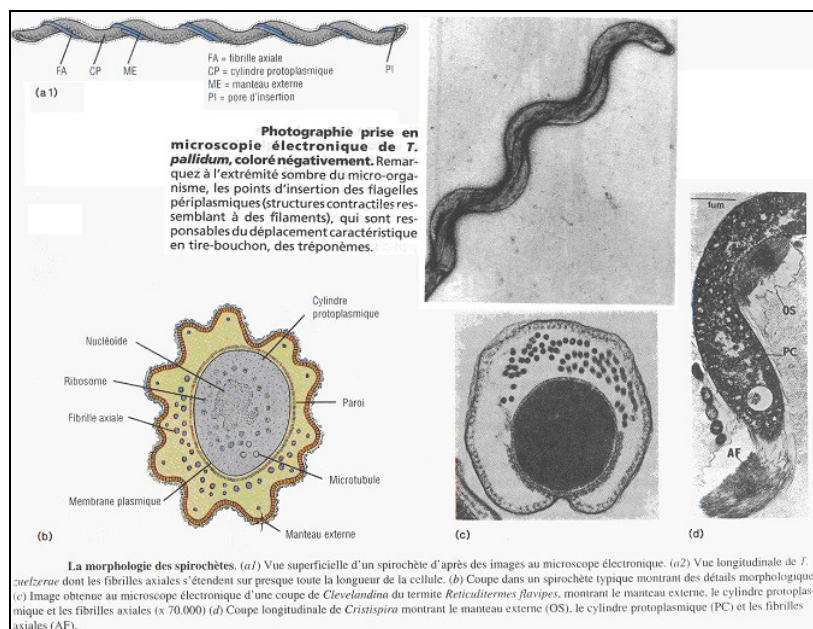
Sur prescription explicite, d'autres cultures sont mises en oeuvre : cultures cellulaires pour l'isolement de *Chlamydia trachomatis* (ou détection par amplification génique) ; milieux artificiels enrichis en sérum de veau et en extrait de levure pour l'isolement et la numération de *Mycoplasma hominis* et de *Ureaplasma urealyticum*.

8.4. Traitement

L'antibiogramme sera systématiquement réalisé dans les infections endocervicales du haut appareil génital sur les germes pathogènes isolés, sur les souches de gonocoque avec recherche de bêtalactamases, et dans le cas du portage des streptocoques du groupe B au cours du troisième trimestre de la grossesse.

LES SPIROCHETES

Les spirochètes sont des bactéries Gram négatives en forme d'hélice parfois peu visibles au microscope. Leur type de mobilité est différent des autres bactéries : elles sont dépourvues de flagelles externes rotatifs mais elles possèdent un **filament axial** à l'intérieur d'une membrane externe souple. Le filament axial est constitué de flagelles périplasmiques responsables de la mobilité.



Les spirochètes sont extrêmement variés du point de vue métabolique comme du point de vue écologique : on les retrouve dans les eaux douces et marines, dans les sols, dans l'appareil digestif des animaux... Les genres *Treponema*, *Borrelia* et *Leptospira* sont des genres pathogènes importants. Certains spirochètes deviennent pathogènes en association avec des bactéries anaérobies (avec *Fusobacterium* au cours de l'**angine de Vincent**).

***Treponema pallidum* : agent de la syphilis**

T. pallidum est si fin qu'il est difficilement observable en microscopie photonique, et il est incapable de cultiver sur des milieux artificiels. Il est très sensible aux désinfectants et à la chaleur. Les deux principales voies de transmission sont les rapports sexuels et la voie transplacentaire. Les germes pénètrent à travers les muqueuses ou au niveau de petites lésions de la peau. La multiplication des germes est locale et extracellulaire, mais certains d'entre eux peuvent être transportés dans les vaisseaux lymphatiques puis la circulation sanguine. La **syphilis primaire** au cours de laquelle apparaît le **chancre syphilitique** est indolore, alors que la **syphilis secondaire**, résultat de la diffusion systémique du germe, engendre des symptômes variables en fonction de la localisation des foyers infectieux secondaires. La **syphilis tertiaire** peut se développer plusieurs années après l'infection primaire, les tréponèmes restant latents sans provoquer de signes cliniques.

***Borrelia burgdorferi* : agent de la maladie de Lyme**

Borrelia burgdorferi est de culture difficile (dans un milieu liquide complexe incubé à 33°C). La borreliose de Lyme est une maladie transmise par les **tiques**. La maladie commence par une infection localisée : une lésion locale apparaît puis a tendance à s'étendre (*erythema migrans*) autour du site de la morsure de l'animal. Les germes peuvent migrer et coloniser secondairement d'autres sites de la peau, mais aussi le système nerveux, les articulations, le cœur...

***Leptospira interrogans* : agents des leptospiroses**

Le réservoir des leptospires est essentiellement animal et leur dissémination se fait surtout par les urines contaminées. Les signes cliniques des leptospiroses sont variables : du syndrome grippal jusqu'à des atteintes graves de certains organes (rein, système respiratoire, système nerveux...).