الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Yahia FARES de MEDEA

Faculté des Sciences

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة يحي فارس بالمدية

كليـة العلـوم

N°:……/CSF/2018

POLYCOPIE DE COURS

« INTITULÉ» Microbiologie medicale

Auteur :

RAHAL Mohamed

Destiné aux étudiants de

Discipline : biologie

Spécialité : microbiologie appliquée

Niveau : Master 2

Année :2019/2020

Approuvé par le Conseil Scientifique de la Faculté en date du: 27/09/2020

Table des matières

TOXINES BACTERIENNES 8
DEFINITION : 8
I. Interets 8
1. Thérapeutique 8
Bactéries Toxigénes et maladies 9
Méthodes d'études 9
2. Résultats 9
3. Détermination activité toxique 10
Classification des exotoxines 10
Selon mode d'action sur membrane cellulaire 10
Actifs sur les lymphocytes T = Superantigénes 11
Translocation et action /cible intra cellulaire spécifique 12
CONCLUSIONS 18
LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE 22
Introduction 22
A/ LES BACTERIES INDICATRICES DE CONTAMINATION FECALE : 22
A.1. Coliformes totaux (CT) 22
A.2. Coliformes fécaux (CF) ou coliformes thermotolérants (CTT) 23
B/ PRINCIPALES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE 23
1. Escherichia coli O157 :H7 et les *Escherichia* producteurs de Shigatoxines (STEC) .. 23
2. Shigella 29
2.1. Classification des shigelles 29
2.2. Structure antigénique 30
2.3. Caractères biochimiques 30
2.4. Pathogénie 30
3. Diagnostic 31

4- Yersinia 33
Généralités 33
Diagnostic bactériologique direct 35
Yersinia enterocolitica et Yersinia pseudotuberculosis 36
2/ Adénite mésentérique (*Y. pseudotuberculosis*) 37
Conclusion 39
(VIBRIO CHOLERAE) 40
Généralités 40
Habitat et pouvoir pathogène 41
Pathogénicité 42
Diagnostic microbiologique 43
Vibrio parahémolyticus 48
Legionella 50
Introduction 50
Taxonomie 50
Caractères bactériologiques 50
La tuberculose : Mycobacterium tuberculosis complex 60
Généralité 60
Habitat et pouvoir pathogène 61
Démarche diagnostique 66
III.1. Éléments évocateurs 66
III.C.1. Prélèvements 69
III.C .2. Examen direct 71
III.C .3. Méthodes de culture 73
III.D. 2.b. Détection génomique 78
Traitement 78
Antibiogramme 78

Corynebacterium diphtheriae 83
Introduction 83
II. Diphtérie : 84
III. Diagnostic de la diphtérie 85
III.3. Méthodes d'identification et diagnostic différentiel 87
Sensibilité aux antibiotiques 90

Liste des Figures

Figure 1mécanisme de fixation de la toxine sur récepteur non-spécifique avec formation des pores (photo anonyme). 11
Figure 2Mode d'action des toxines se comportant comme des superantigènes (Charles Nauciel n.d.) 12
Figure 3mécanisme physiopathologique de vibrio cholerae o1 ou o139 (Des et al. n.d.) 13
Figure 4Mécanismes d'action de la toxine diphtérique à activité intracellulaire (photo anonyme). 14
Figure 5Mécanismes d'action de la Vérotoxine shigella à activité intracellulaire (photo anonyme). 15
Figure 6mécanisme d'action de la toxine botulique (photo anonyme). 16
Figure 7 Schéma général du processus d'intoxication par la toxine létale et la toxine oedématogène de B. anthracis (photo anonyme). 17
Figure 8 Lésions d'attachement et d'effacement des EHEC (photo anonyme). 24
Figure 9 Mécanisme d'action de la Shigatoxines (photo anonyme). 25
Figure 10 Aspect des colonies d'Escherichia coli O157 : H7 Colonies sorbitol – sur milieu SMAC – céfixime-tellurite ; à gauche, d'Escherichia coli sorbitol positif à droite (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2011a). 27
Figure 11 Principe de mise en évidence des EHEC dans les selles (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2011a). 27
Figure 12 Phlyctène a gauche et charbon pesteux a droite (photo anonyme). 34
Figure 13 Yersinia pestis après coloration de Gram (Denis, Bidet, and Bingen 2011). 35
Figure 14 Aspect des colonies d'Y. enterocolitica sur gélose CIN.(Denis, Bidet, and Bingen 2011) 38
Figure 15 Aspect typique incurvé de Vibrio cholerae (Denis, Bidet, and Bingen 2011). 40
Figure 16 mécanisme physiopathologique de vibrio cholerae o1 ou o139 (Des et al. n.d.). 43
Figure 17 Étapes du diagnostic bactériologique direct de Vibrio cholerae : diagnostic classique et prospectif (Denis, Bidet, and Bingen 2011). 45
Figure 18 Aspect des colonies de Vibrio cholerae sur milieu TCBS (Denis, Bidet, and Bingen 2011) 46
Figure 19 Sérotypes de Vibrio cholerae (Denis, Bidet, and Bingen 2011). 47
Figure 20 Vue à la loupe, l'aspect en verre brisé (Denis, Bidet, and Bingen 2011) 51

Figure 21 Morphologie des légionelles vues au microscope (coloration de Gram à la fuchsine phéniquée à gauche et immunofluorescence à droite) (Denis, Bidet, and Bingen 2011)..... 51
Figure 22 Culture de légionelles : aspect des colonies (Denis, Bidet, and Bingen 2011)..... 55
Figure 23 Schéma récapitulatif du diagnostic par culture (Denis, Bidet, and Bingen 2011)... 57
Figure 24 Formation de la lésion initiale primaire. La multiplication du bacille au sein des cellules phagocytaires aboutit à la mort de ces cellules qui sont phagocytées par de nouveaux macrophages qui ont été recrutés au site de l'infection 64
Figure 25 Équilibre physiopathologique lors de la tuberculose (Martin and Denis 2011). 65
Figure 26 Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries (Martin and Denis 2011). 68
Figure 27 Étapes de la décontamination d'un produit pathologique. Exemple de la méthode de Kubica (Martin and Denis 2011)..... 70
Figure 28 : Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen (grossisse ment ´ 1000). Présence de bacilles colorés en rose (BAAR). A droite regroupement en « cordes » (Martin and Denis 2011). 72
Figure 29 Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration à l'auramine (grossissement ´ 400). Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent (BAAR) (Martin and Denis 2011). 72
Figure 30 Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine (Martin and Denis 2011). 73
Figure 31 Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen (Martin and Denis 2011)..... 74
Figure 32 Arbre décisionnel pour l'identification des mycobactéries au laboratoire (Martin and Denis 2011). 76
Figure 33 Étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries de la tuberculose sur milieux solides (Löwenstein-Jensen) par la méthode des proportions (Canetti, Rist, Grosset). 79
Figure 34 Étude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec) (Martin and Denis 2011). 80
Figure 35 Principe des méthodes d'identification et de détection de la résistance aux anti-tuberculeux par PCR et hybridation sur support solide (Martin and Denis 2011). 81
Figure 36 : Corynébactéries typiques coloration de Gram (Gram 2011) 83
Figure 37 La Diphtérie : pathogénie à gauche et diphtérie Nasopharynx : formation de pseudomembranes à droite (Gram 2011). 85

Figure 38 Diphtérie cutanée : se présente comme des pseudomembranes nécrotique, mais les conséquences à distance sont plus rares (Gram 2011). 85
Figure 39 Aspect en massue d'une corynébactérie en microscopie électronique (Gram 2011). 86
Figure 40 aspect carracterestiques des colonies de Corynebacterium diphtheriae sur milieucytéine-tellurite, milieu de Tinsdale colonies noires entourées d'un halo noir (photo anonyme). 87
Figure 41 Schéma général du diagnostic bactériologique de C. diphtheriae (Gram 2011)..... 88
Figure 42 Autopsie de cobaye après inoculation par voie sous-cutanée d'une culture de C. diphteriae toxinogène. À gauche, animal protégé par antisérum (pas d'hémorragie des surrénales). À droite, cobaye non protégé (hémorragie des surrénales) (Gram 2011)..... 89
Figure 43 Test d'Elek. De gauche à droite : souche de référence toxine –, souche à tester toxine +, souche de référence connue toxine +. Effet cytopathogène sur cellules vero (Gram 2011)..... 89

Liste des tableaux

Tableau 1: Bactéries Toxigénes et maladies 9
Tableau 2 : Vibrions cholériques (Vibrio cholerae O1 et Vibrio cholerae O139) et principaux vibrions non cholériques d'intérêt médical 41
Tableau 3: Diagnostic différentiel entre les biovars cholerae et El Tor. 47
Tableau 4: Supports fondamentaux des particularités du diagnostic au laboratoire des infections à mycobactéries. 62
Tableau 5 : Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactéries 71
Tableau 6**:** Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose 77
Tableau 7 Biotypes de Corynebacterium diphtheriae. 88

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr.Yahia FARES de MEDEA
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

RAHAL Mohamed

TOXINES BACTERIENNES

DEFINITION :

Les substances toxiques formés dans ou élaborées par des bactéries, elles sont généralement des protéines à haut poids moléculaire et de l'antigénicité (Protéine enzymatique. fonction de catalyseur et responsable de symptômes cliniques), certains sont utilisés comme des antibiotiques et un peu de peau pour tester la présence ou la susceptibilité à certaines maladies).

Plusieurs classifications ont été proposées pour séparer les facteurs bactériens toxiques. Certains de ces facteurs sont des composants structuraux de la bactérie : c'est le cas du lipopolysaccharide de la paroi des bactéries à Gram négatif, ou endotoxine ; Libérée des bactéries en division ou lysées par la réponse immunitaire (rôle dans le choc des états septiques. Et les exotoxines bactériennes, c'est-à-dire les toxines qui sont actives en étant sécrétées. Leur classification la plus évidente repose sur leur mode d'action : certaines d'entre elles agissent à l'extérieur de la cellule en se liant avec des récepteurs cellulaires ou en réalisant des pores dans la membrane. D'autres sont capables d'induire la translocation d'un fragment catalytique dans le cytoplasme de la cellule.

I. Interets :

1. Thérapeutique:

Traitement des anomalies motrices (strabisme ; remodelage esthétique ; dystonies)

Traitement K (Tox diphtérique)

Agronomie : Prévention insecticides dangereux :

Militaire : Arme biologique (charbon ; botulisme)

Biologie Moléculaire Biologie : Outils

Tableau 1: Bactéries toxigénes et maladies

Maladies	**Bactéries**
Diphtérie	*Corynebacterium diphteriae*
Tétanos	*Clostridium tetani*
Botulisme	*Clostridium botulinum*
Choléra	*Vibrion cholerique*
Charbon	*Bacillus anthracis*
Choc septique	*Staph aureus et Strepto pyogenes*
Gangrene gaz	*Clostridium perfringens*

Méthodes d'études

Extraction :

-Surnageant de culture, lysat bactérien

Purification : électrophorèse, chromatographie, ultracentrifugation ; électrolocalisation

2. Résultats :

Propriétés physiques : Thermolabilité, sensibilité suc gastriques ; Acides ; urée

Propriétés Chimiques : Holoprotéines (protéine constituée uniquement d'acides aminés) – Monocaténaires –Bicaténaires -Plusieurs chaînes

Propriétés biologiques :

-Cytotoxicité spécifique (ex : neurones)

-Large (mort non spécifique = nécrose)

Cytotoxicité influencée par : Terrain (Age ; sexe ; race), dose et voie, fièvre et état de jeun

3. Determination activité toxique : Titrage

- **Matériel** : Animal ou Culture de cellule
- **Méthode** : Directe sur Animal ou sur cellules : Recherche un pouvoir lethal

DL50 (C'est la masse de substance nécessaire pour tuer 50 % des animaux dans un lot. Elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme d'animal, Quant à elle, la **DL100** est la dose létale, engendrant la mort de 100 % des individus d'une population animale donnée).

Indirecte : Recherche d'une propriété antigénique

Classification des exotoxines

Selon mode d'action sur membrane cellulaire

a- Fixation sur récepteur non-spécifique

De structure : enzymatique : PHOSPHOLIPIDES

Effet sur cellule : Lyse

Effet sur l'hôte : lyse, gangrène ; diffusion de l'infection :

EX : Phospholipase de C .*perfringens* = αtoxine et Phospholipase de *pseudomonas*

b- Fixation sur récepteur non-spécifique en formant des pores :

Cholestérol avec formation de pores (hémolysines) Effet sur cellule : Hémolyse «in vitro» ; mais pas effet sur le pouvoir pathogène reconnaissance récepteur : cholestérol mécanisme oligomères insertion sur membrane et changement conformation ensuite formation de pores ce qui aboutit à une lyse cellulaire et alors que l'effet sur l'hôte se traduit par diffusion de l'infection ; détruit les macrophages, fuite de K+

EX : Bactéries GRAM (+) extra cellulaire (Strepto, SLO) ; Bacillus ; listéria ;

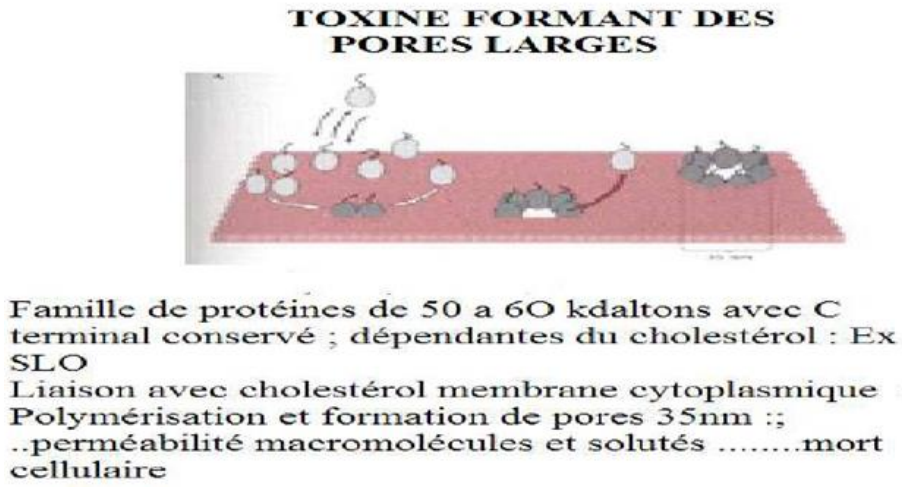


Figure 1: mécanisme de fixation de la toxine sur récepteur non-spécifique avec formation des pores (photo anonyme).

c- Fixation sur récepteurs spécifiques : protéines transmembranaires guanine

Structure : Enzyme (Guanilate cyclase)

Activité : Catalyse formation grande quantité de Guanine Monophosphate : (GMP) par dégradation de GTP en GMP cyclique ou GMPc (second messager) ensuite une amplification d'un message hormonal aboutissant à une réponse cellulaire.

Conséquence : Sur la cellule Hypersécrétion de chlore et chez l'hôte : Hypersécrétion d'eau et électrolytes EX : shiga toxine de *E.Coli*

Actifs sur les lymphocytes T = Superantigènes

Les **superantigènes** sont des toxines de nature protéique qui se lient simultanément à une chaîne bêta (Vb) d'un récepteur des cellules T et à une molécule de CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II. L'interaction forcée qui s'établit entre la cellule présentatrice d'antigène portant le CMH et les lymphocytes T dont le récepteur des cellules T porte ce segment Vb provoque une stimulation polyclonale de ces lymphocytes T, indépendamment de leur spécificité pour l'antigène peptidique présenté

Sur l hote : Fièvre Choc

Ex : TSST1 Staphylocoque, Toxine scarlatine

Elles se fixent d'une part sur la partie variable de certaines chaînes β du récepteur T et d'autre part sur les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité. Cette interaction active les cellules qui libèrent alors des cytokines.

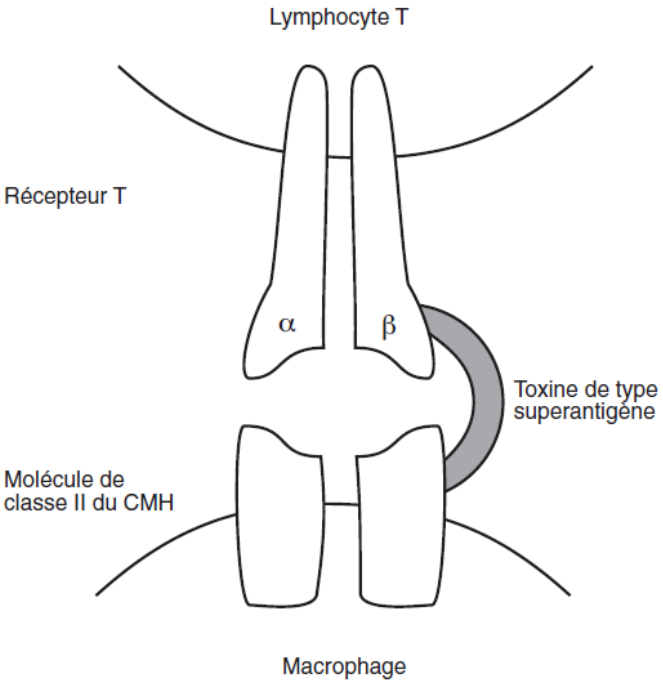


Figure 2: Mode d'action des toxines se comportant comme des superantigènes (Charles Nauciel n.d. Jean-Louis Vildé).

Translocation et action /cible intra cellulaire spécifique

Structure : Plusieurs domaines possédant deux types de chaînes polypeptidiques (A et B). La chaîne B se fixe sur un récepteur membranaire et permet à la chaîne A de traverser la membrane et d'agir sur une cible intracellulaire.

On connaît 4 activités Enzymatiques

1 ADP ribosylation de la cible avec comme de la cible avec comme résultat

- Hyperactivité (ex : *Vibrio cholera*)
- Inactivation : (ex : diphtérie ; coqueluche)

2) Activité enzymatique par clivage ARNribosomal

3) Activité enzymatique Protéolytique

4) Activité enzymatique : Adényl cyclase

1) *ADP* ribosylation de la cible entraînant une Hyperactivité (ex : *Vibrio cholérae*)

La toxine cholérique est le facteur pathogène de la maladie du choléra. Il s'agit d'une protéine constituée de deux sous unité différente : cinq sous-unité B est responsable de la fixation aux cellules intestinales, la sous-unité A (2S/U : A1 A1et A2 ; A1 est porteuse de l'activité catalytique).

La première étape du mode d'action de l'exotoxine protéique est la fixation de la sous unité B à un récepteur lipidique, le monosialoganglioside GM1 Puis, par un mécanisme mal résolu, la toxine est internalisée dans la cellule intestinale La sous unité A conduit à la stimulation de l'adénylatecyclase des membranes basales et latérales des entérocytes ce qui entraîne une accumulation importante d'AMPc. *(Plus précisément, la sous unité A transfère un groupement ADP-ribose sur la protéine G stimulante (Gs). Ainsi ADP ribosylée, la protéine Gs demeure continuellement sous forme active et stimule en permanence l'adénylate cyclase).* Cette augmentation intracellulaire d'AMP_C aboutit à une perturbation des transporteurs ioniques membranaires comme le canal CFTR qui va laisser passer massivement des ions chlorures dans la lumière intestinale alors que l'absorption couplée des ions Na^+ et Cl^- est inhibée. Le contenu du tube digestif devient ensuite hypertonique par rapport au cytoplasme des entérocytes. Selon les lois de l'osmose, l'eau passe du cytoplasme dans la lumière du tube digestif. L'eau perdue par le cytoplasme est aussitôt compensée par de l'eau provenant du chorion et du sang. La volémie puis la pression artérielle chute. La diarrhée résulte donc d'une hypersécrétion d'eau, la toxine cholérique est dite cytotonique. La muqueuse intestinale reste intacte, le microorganisme n'a pas franchi l'épithélium intestinal, il n'y a donc pas de réaction inflammatoire.

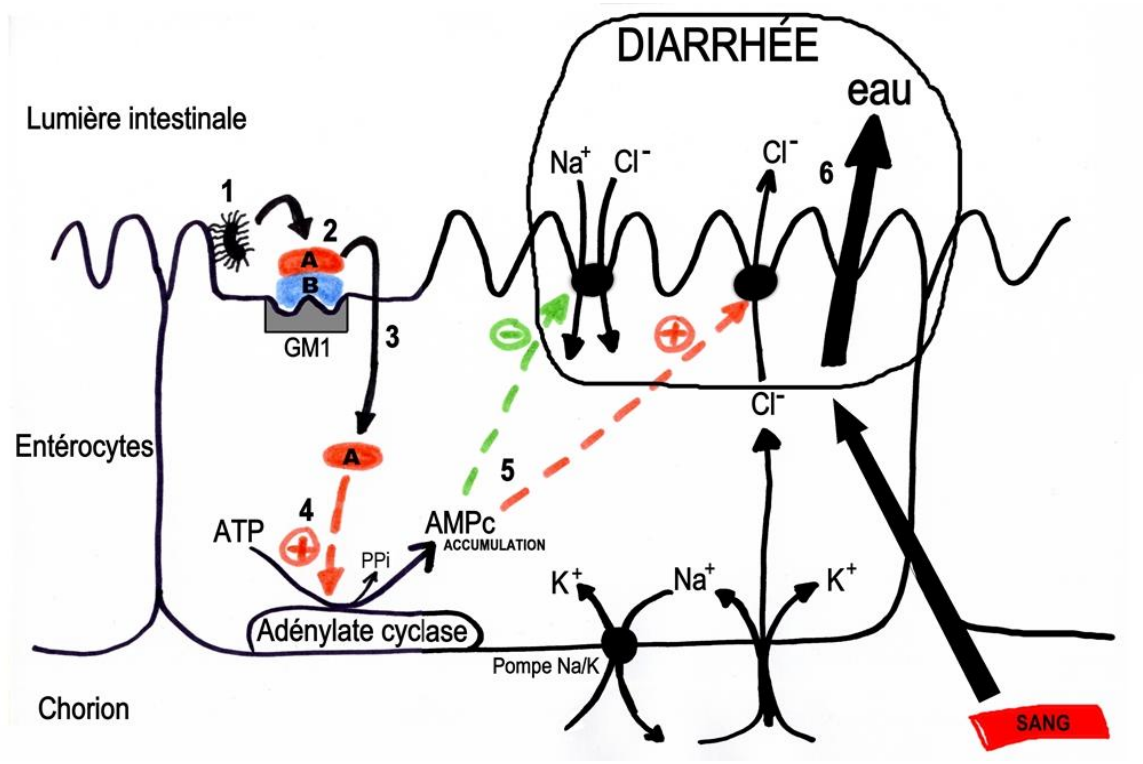


Figure 3: mécanisme physiopathologique de *vibrio cholerae* o1 ou o139 (Des et al. n.d.)

2) ADP ribosylation de la cible entraînant une inactivation de la cible

Ex : diphtérie et coqueluche

La toxine diphtérique est une exotoxine pantrope (n'ayant pas de spécificité cellulaire) composée de 3 sous-unités :

- la chaîne T : domaine de translocation ;
- la chaine C : domaine catalytique ;
- la chaîne R : domaine récepteur aux cellules.

Fixation du domaine R sur son récepteur membranaire

Internalisation du complexe toxine-récepteur et formation d'un endosome ;

Interaction du domaine T avec la membrane de l'endosome, puis, sous l'influence du pH de l'endosome, translocation de la toxine et libération du domaine C dans le cytoplasme

Action du domaine C en agissant par ADP-ribosylation. Il bloque le facteur d'élongation (EF-2) qui transforme le GTP en GDP (mouvement des ribosomes sur l'ARN messager) en agissant sur le complexe EF-2-ADP-ribosome.

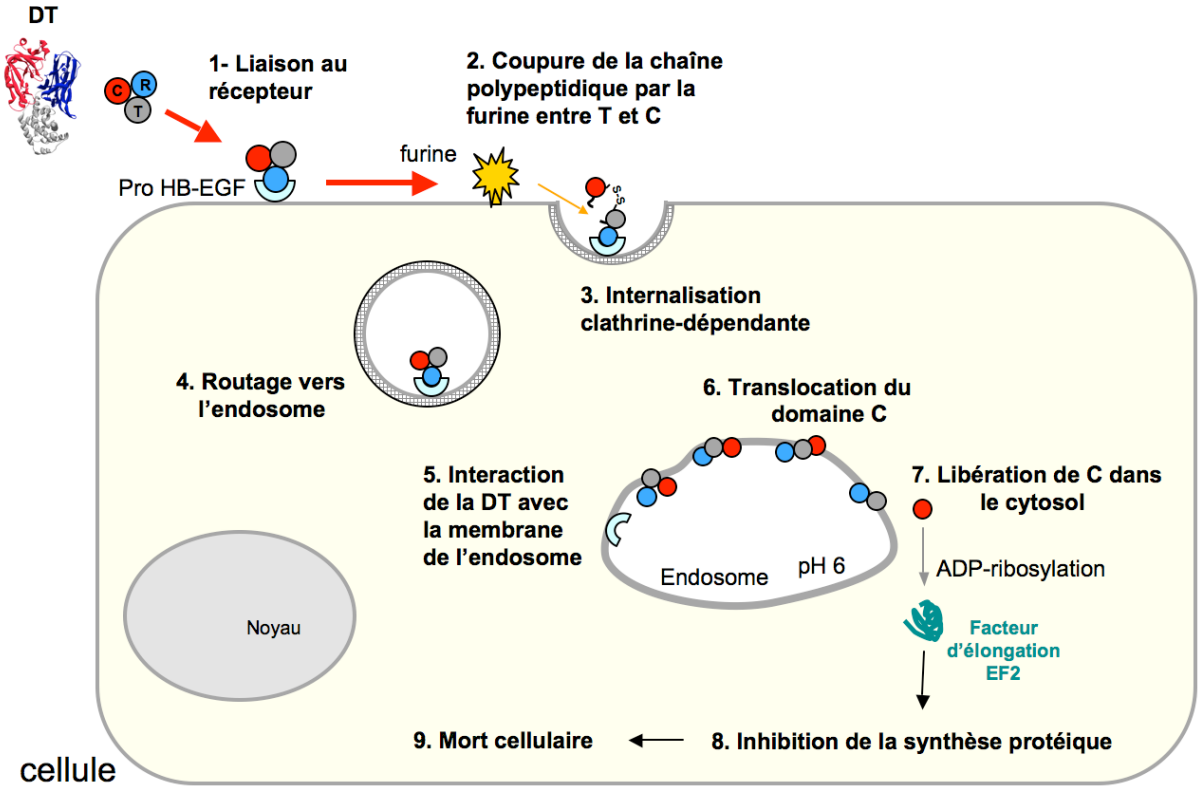


Figure 4: Mécanismes d'action de la toxine diphtérique à activité intracellulaire (photo anonyme).

2) Activité enzymatique par clivage ARNribosomal

Activité : Clive liaison glycosidique de l'adénosine de L' ARN 28s = Inactivation de L' ARN 28s = Conséquence : Arrêt synthèse protidique : Ex ; Vérotoxine *shigella*. Toxine ECEH

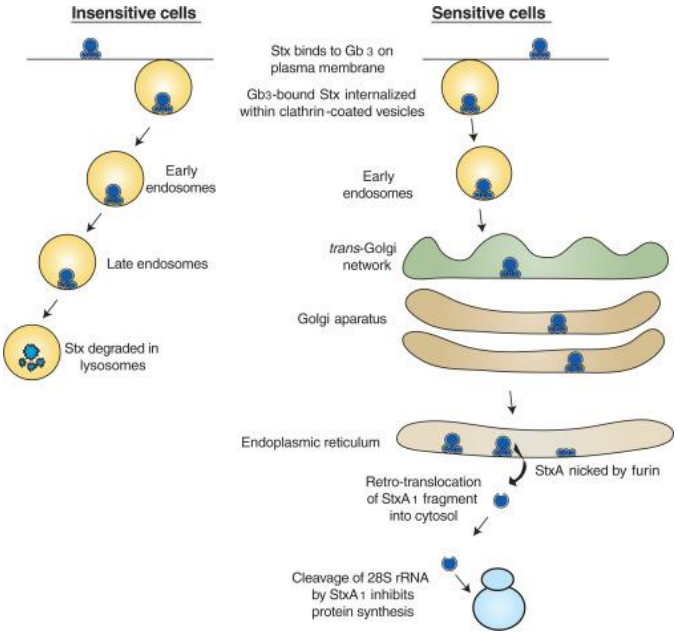


Figure 5: Mécanismes d'action de la Vérotoxine *shigella* à activité intracellulaire (photo anonyme).

Activité enzymatique Protéolytique

Ex : Toxine tétanique et botulinique

La toxine tétanique est surtout produite pendant la phase exponentielle de croissance de la bactérie. A partir de la plaie, la toxine tétanique va atteindre le système nerveux soit par une voie sanguine soit directement par adsorption au niveau des synapses neuromusculaires L'action de la toxine tétanique se traduit par la production des spasmes et convulsions par inhibition des nerfs moteurs, qui vont répondre de façon permanente et exagérée aux stimuli extérieurs. La neurotoxine bloque la sécrétion de la glycine (responsable de la relaxation musculaire) ce qui aboutit à des spasmes musculaires généralisés.

La toxine botulique

La toxine est un polypeptide à deux chaînes, une lourde (H : *Heavy*) et une légère (L : *Light*)

La toxine botulique bloque la transmission neuromusculaire en empêchant la libération de l'acétylcholine par exocytose au niveau de la terminaison neuronale.

La chaine lourde de la toxine se fixe aux récepteurs cholinergiques avec une forte affinité puis est internalisée par endocytose dans la terminaison nerveuse. Puis la chaine légère est transloquée dans le cytosol après formation d'un pore dans la membrane de la vésicule et va induire le clivage d'une protéine indispensable à la libération de l'acétylcholine, la SNAP25 (Synaptobrévine) par une activité endopeptidase.

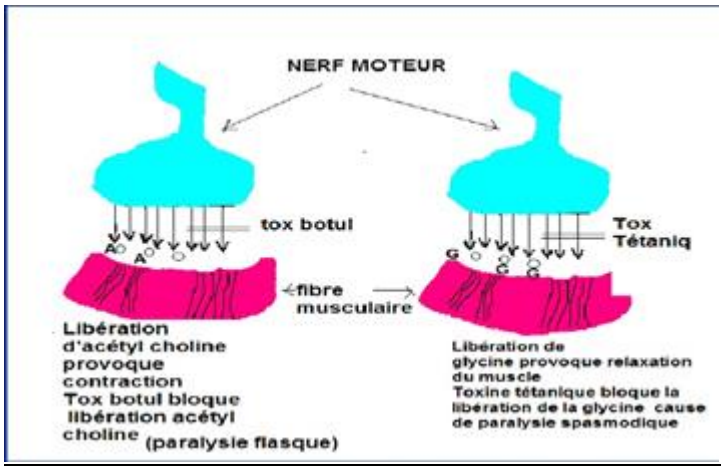


Figure 6: mécanisme d'action de la toxine botulique (photo anonyme).

4) Activité enzymatique : Adényl cyclase

EX: *Bacillus anthracis*

Structure TOXINE:3 protéines

PA = pénétration antigène

EF = Adényl cyclase (facteur oedémateux)

LF = Activité métalloprotéase (facteur lethal)

Les toxines de *B. anthracis*, la toxine oedématogène (EdTx) et la toxine létale (LeTx) sont composées chacune de deux protéines sécrétées dont l'une est commune aux deux toxines. Les trois protéines sont appelées antigène protecteur (PA), facteur létal (LF) et facteur oedématogène (EF). Séparément chacun des trois composants est totalement inactif *in vivo* et *in vitro*. Deux de ces protéines (EF et LF) ont une activité toxique qui ne peut s'exercer que par l'intermédiaire de la troisième protéine, l'antigène protecteur (PA).

Les combinaisons PA-EF et PA-LF constituent respectivement :

- la toxine oedématogène, une adénylate cyclase dont l'activité nécessite la présence d'une protéine exclusivement eucaryote, la calmoduline ;

- la toxine létale, une métalloprotéase à zinc capable de couper les MAP kinases kinases qui constituent un des trois modules de la chaîne d'activation MAPK responsable du transfert d'informations extérieures à la cellule vers le noyau au niveau transcriptionel.

Afin d'exercer leur activité enzymatique, LF et EF doivent être transportés au sein du cytosol via PA.

Après fixation sur le récepteur "tumor endothelium marker 8" (TEM8)/ATR de la membrane cellulaire, la molécule native PA subit une protéolyse limitée par la furine, au site consensus, en deux polypeptides de 20 kDa (PA20) et 63 kDa (PA63). Les fragments PA63 peuvent alors s'associer spontanément pour former un heptamère et interagir avec EF ou LF. Trois molécules de LF et/ou EF peuvent se fixer par heptamère de PA63. L'internalisation de ces complexes, permettant de délivrer le facteur létal LF et le facteur oedématogène EF au sein du cytosol des macrophages à partir des vésicules de l'endosome précoce, est réalisée via un processus "clathrin-dependent". LF et EF adoptent des stratégies différentes afin d'exposer leur site catalytique au sein du cytosol : LF est totalement libéré dans le cytosol; EF reste associé à la membrane endosomiale.

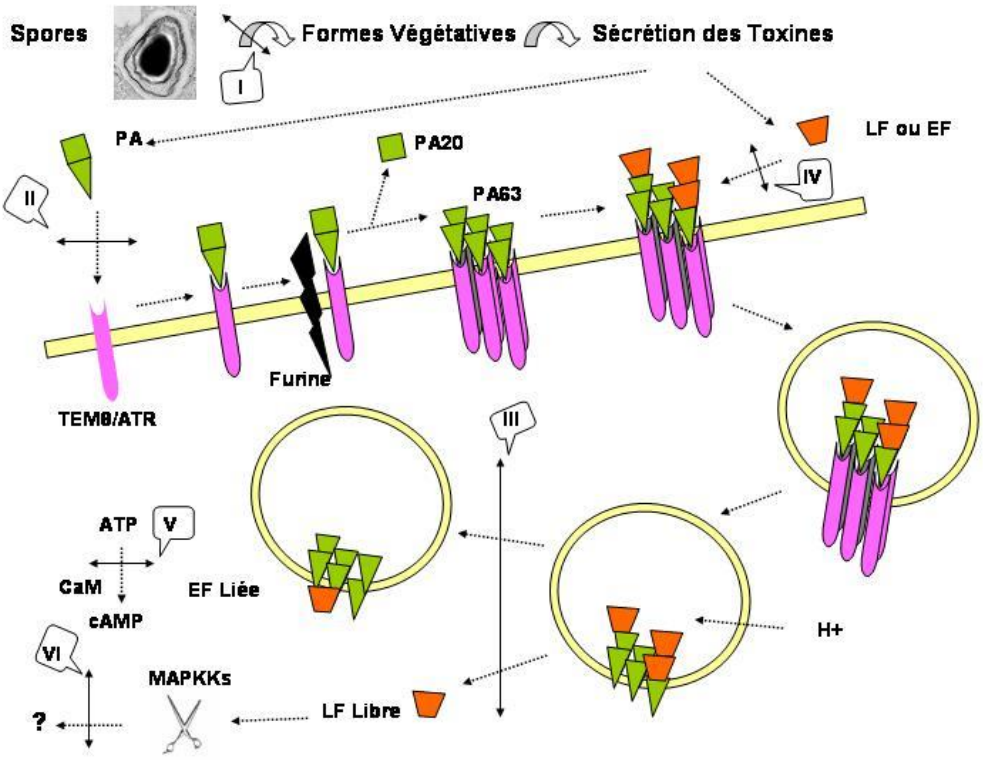


Figure 7: Schéma général du processus d'intoxication par la toxine létale et la toxine oedématogène de B. anthracis (photo anonyme).

CONCLUSIONS

Connaissance actuelle du mode d'action d'un grand grand nombre de toxines a permis de constater que les PROTEINES G sont les cibles les plus fréquentes des toxines)

Connaissance mode d'action explique : Pathologies

Outils de biologie cellulaire (connaissance neurosécrétion trafic vésiculaire)

Outils Thérapeutiques (vaccins ; immunotoxines)

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES TOXINES PROTEIQUES

Selon les cibles tissulaires

- ✓ Neurotoxines ;(tétanos, botulisme)
- ✓ entérotoxines ; (cholérique ; LT *E coli*)
- ✓ néphrotoxines
- ✓ Pantrope (diphtérie)

Selon les cibles cellulaires : Hémolysines, Leucocidines

Selon la physiopathologie

Toxines responsables en partie de la maladie : Coqueluche, gangrène gazeuse pyocyanique, Peste

Toxine responsable en totalité de la maladie : Choléra, Diphtérie, Dysenterie, Choc toxique staphylococcique

PROPRIETES ANTIGENIQUES

Puissants immunogènes :

-Transformables en anatoxine (vaccin)

-Immunité conférée n'est pas définitive (entretenir)

-Induit des anticorps protecteurs

(Immun sérums=antitoxines)

PROPRIETES ANTIGENIQUES : Anatoxines : 2 types

-**Toxoide naturel = toxine naturelle par transformation** spontanée Mécanisme transformation non elucidé non utilisé en médecine humaine

Anatoxine détoxifiée artificielle

Toxine naturelle détoxifiée, mécanisme de transformation élucidé

Propriétés antigéniques : Détoxification artificielle

Vieillissement : toxine en 3 a 4 semaines. En présence de formol A 40 Degrés

PH: alcalin (dipht et tétanos):

acide (botulique)

Mutagène chimique : on obtient une molécule hybride Anatoxine +Protéine ou peptide ou polyoside

Application : vaccins conjugués

Peptides de synthèse: Boucle de 16 AA du fragment A(tox dipht). 44 AA entérotoxines érotoxines ST

PROPRIETES ANTIGENIQUES : Antitoxines

Obtention: Immunisation animaux avec anatoxines: saignée après 5 semaines

Purification

Des γ globulines =antitoxines

Inconvénients: Choc anaphylactique; allergie,

INDICATIONS : Recherche de toxine lors :

- ✓ Toxiinfections alimentaires
- ✓ Syndrome entérique
- ✓ Syndrome hémolytique et urémique
- ✓ syndrome de choc toxique
- ✓ Diphtérie

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. “DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ’ UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE.” : 1–37.

Bébéar, C, and C M Bébéar. “C. Bébéar, C.M. Bébéar.”

Bingen, E. “Analyse Bactériologique Des Selles.”

Colobert, L. 1967. “La Biologie Moléculaire.” *La Presse medicale* 75(31): 1623–24.

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. “Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ’ Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents.” *Techniques*.

Denis, F, P Bidet, and E Bingen. 2011. “Bacilles à Gram Négatif Aérobies et Aéro-Anaérobies.” *Bactériologie Médicale*: 331–427.

Fièvre, La et al. 2007. “Marion DEBIN.” *Année*: 2007–3.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. “Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire.” *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Garnier, F., M.-C. Ploy, and F. Denis. 2011. “Cocci à Gram Négatif.” *Bactériologie Médicale*: 321–30.

Gram, Bacilles. 2011. “Bacilles à Gram Positif (à l’exception Des Anaérobies).” *Bactériologie Médicale*: 443–74.

Leishmanioses, L E S. 2012. “Pour l ’ Obtention Du Doctorat En Pharmacie.” *These*.

Lucas, F et al. 1991. “Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ’ Action To Cite This Version :”

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. “Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes.” *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen. 2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Martin, C., and F. Denis. 2011. “Mycobactéries.” *Bactériologie Médicale* 3: 507–35.

Ploy, M.-C., and F. Denis. 2011. “Orientation Générale.” *Bactériologie Médicale*: 283–85.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr.Yahia FARES de MEDEA
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE **module : Microbiologie médicale**

LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE

Introduction

L'eau est indissociable de la vie et en particulier de celles des populations humaines dont elle a influencé l'histoire et conditionné le développement. Elle est aussi un des principaux vecteurs de la transmission de nombreuses maladies qui sont à l'origines d'importantes épidémies humaines ou animales. De nombreux germes infectieux sont ainsi transmis et entrainent une mortalité humaine élevée.

Il s'agit de microorganismes pouvant exister à l'état naturel ou être le résultat d'une contamination par des matières fécales d'origine humaine ou animale. Les sources d'eau de surface, comme les lacs, les rivières et les réservoirs sont plus susceptibles d'en contenir que les sources d'eaux souterraines, à moins que ces dernières ne le soient sous l'influence directe des eaux de surface.

Cependant les microorganismes pathogènes les plus impliqués dans la transmission de maladies liées à l'eau sont bien connus et ne se résument pas uniquement aux bactéries entériques

A/ les bactéries indicatrices de contamination fécale :

Ce sont les indicateurs microbiens de pollution fécale appelés aussi germes test ou germes témoins de contamination fécale

A.1. Coliformes totaux (CT)

Les coliformes totaux correspondent à des bacilles Gram négatif, non sporulés, oxydase négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs. Capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48heures à une Ils se répartissent en deux catégories :

Les germes d'origine fécale stricte : *Escherichia coli, Citrobacter, Levinea, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae*

o Les germes provenant d'autres sources environnementales (aquatique ou terrigène) : *Enterobacter intermedium et amnigenus, Klebsiella terrigena, Buttiauxella agresti* température de 35-37°C

A.2. Coliformes fécaux (CF) ou coliformes thermotolérants (CTT)

Ce sont des bacilles gram négatifs, aérobie, anaérobie facultatifs, Oxydase (-), Lactose (+) Les coliformes fécaux sont un sous-groupe des coliformes totaux et comptent parmi leurs membres des espèces de bactéries comme *Escherichia coli et Klebsiella pneumoniae.*

B/ principales bactéries pathogènes d'origine hydrique

L'eau peut être un véhicule de nombreux germes pathogènes entraînant des maladies à transmission hydrique.

Dans le groupe des bactéries à transmission hydrique, on distingue principalement deux types : les bactéries indicatrices de pollution fécale d'une part et les bactéries pathogènes et toxiques d'autre part.

1. Escherichia coli O157 :H7 et les *Escherichia* producteurs de Shigatoxines (STEC)

E. coli entérohémorragique (EHEC) est un pathogène préférentiel du côlon. L'infection à EHEC survient généralement après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés ou après un contact avec des personnes ou des animaux porteurs de la bactérie.

EHEC est capable d'induire, après une étape de diarrhée sécrétoire, une diarrhée sanglante, et éventuellement une hémolyse et une insuffisance rénale. Cette dernière propriété semble liée à la synthèse de toxine du type Shigella.

Pouvoir pathogene

Virulence des EHEC

- **Facteurs de virulence**

1- Adhésion à la muqueuse digestive Adhésion aux entérocytes grâce à des pili spécifiques (CFAs, Css. . .)

2- Production de verotoxine ou shigatoxine thermostables (ST) et/ou thermolabiles (LT)

3- Autres facteurs de pathogénicité

1- Lésions d'attachement et d'effacement

Au niveau du colon et du caecum

Ces souches adhèrent aux cellules épithéliales par des fimbriae dont les gènes sont plasmidiques, elles vont ensuite renforcer leur adhésion et provoquer un effacement

caractéristique **des microvillosités** de la cellule intestinale, grâce à différents gènes chromosomiques, regroupés dans un îlot de pathogénicité appelé LEE (locus d'effacement de l'entérocyte). Le renforcement de l'adhésion est dû à une interaction entre l'intimine exprimée sur la membrane externe de la bactérie et son récepteur situé sur la membrane de l'entérocyte. Le récepteur de l'intimine est en fait une protéine excrétée par la bactérie. La bactérie excrète en effet différentes protéines par un système de sécrétion du type III. Ces protéines vont agir sur la cellule cible. L'effacement des villosités s'accompagne de remaniements du cytosquelette et de perturbations fonctionnelles (fuite d'électrolytes).

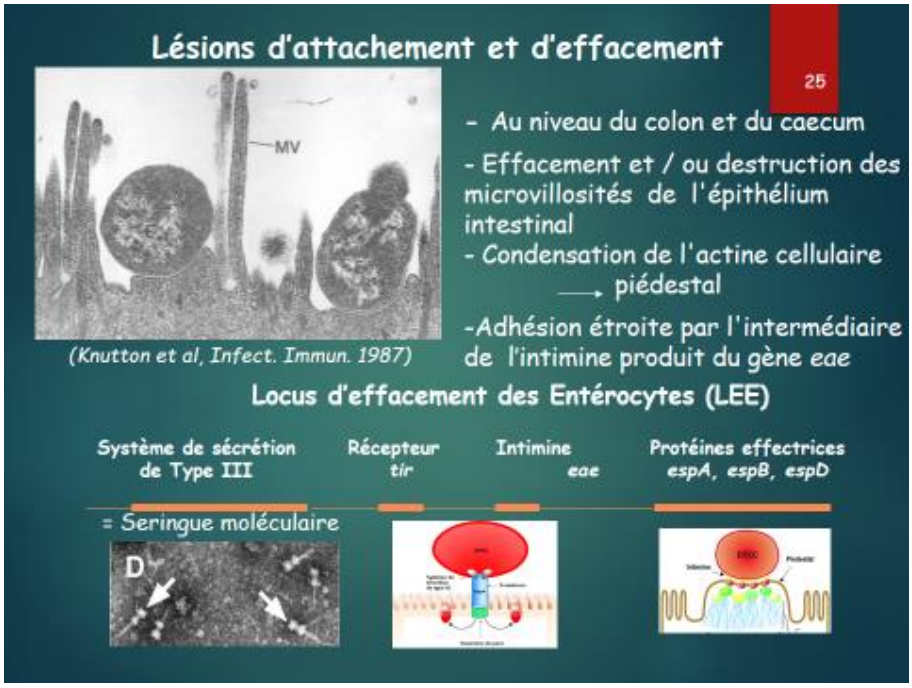




Figure 8: Lésions d'attachement et d'effacement des EHEC (photo anonyme).

2- Verotoxines ou Shiga like toxines

➢ Ce sont des Exotoxines protéiques dont la synthèse est codée par des phages tempérés

(Transfert horizontal du gène stx de *Shigella dysenteriae* type 1 vers *E. coli* par des bactériophages… passage vers d'autres coliformes), qui se fixent sur des récepteurs Gb3 (à la surface des entérocytes, capillaires du TD, sur les cellules endothéliales du rein humain, dans les glomérules des enfants < 2 ans, sur les cellules endothéliales du pancréas et du système nerveux central) ce qui provoque la mort par arrêt de la synthèse protéique

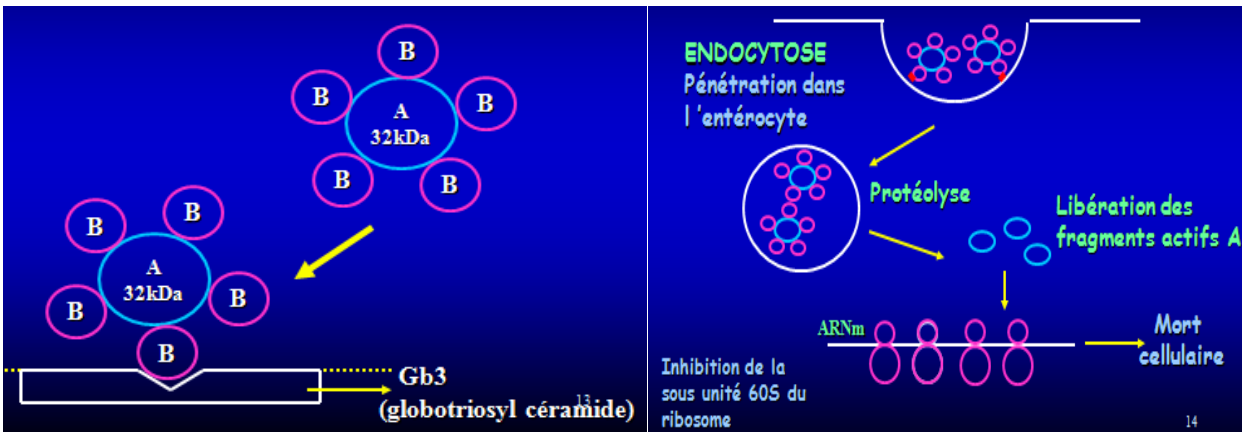


Figure 9: Mécanisme d'action de la Shigatoxines (photo anonyme).

3- Autres facteurs de pathogénicité

➢ Hémolysine gène *ehxA (plasmides)*

➢ Système de transport du fer : gène chuA (chromosome)

➢ Résistance à l'acidité gastrique : gène rpoS codant pour un facteur permettant la survie du Serine protéase (EspP) plasmidique : clivage du facteur V

➢ germe à un pH <2,5

➢ Enterotoxine thermostable EAST1 : diarrhée aqueuse

➢ Catalase (KatP) plasmidique : burst oxydatif des PNN et des macrophages

➢ Toxine Clostridium difficile like

- **SHU POST-DIARRHEE (D+)**

SHU défini par la triade 1- anémie hémolytique 2- thrombopénie (< 150 000/mm^3) 3- insuffisance rénale aiguë.

SHU D+ 90-95 % des SHU du à une infection à *E.coli* producteurs de shiga toxine (Stx)

Diagnostic bactériologique des infections à STEC

Recueil des selles STEC : portage bref 4 à 7 jours maximum après le début des symptômes

a. 1. Mise en évidence des *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)

Le diagnostic des infections à EHEC est difficile, ces bactéries étant rapidement éliminées du tube digestif. De plus, la quantité présente dans les selles reste très faible, surtout au moment de l'apparition du SHU. Le recueil des selles doit s'effectuer au maximum 4 à 6 jours après le début des prodromes digestifs. Le diagnostic repose d'une part sur la mise en évidence des EHEC dans les selles par des méthodes phénotypiques et biochimiques, et d'autre part sur la détection des gènes de virulence (*stx* et *eae*) par des méthodes moléculaires. Il est indispensable de réaliser un enrichissement des selles en eau peptonée pendant 4 à 6 heures à 37 °C. Il existe également un diagnostic sérologique reposant sur l'augmentation du titre sérique des anticorps spécifiques antilipopolysaccharides (LPS).

d. 2. Méthodes biochimiques de détection et d'isolement des EHEC

Les EHEC n'ont pas de propriété biochimique commune permettant leur isolement sur un milieu particulier, sauf le sérotype O157 : H7. En effet, contrairement aux autres *E. coli E. coli* O157 : H7 ne fermente pas le sorbitol et ne possède pas de β -glucuronidase. Ainsi, l'absence de fermentation de sorbitol a justifié l'utilisation de la gélose MacConkey au sorbitol (SMAC). Le milieu SMAC a été rendu plus sélectif par l'adjonction de tellurite et de céfixime dont les CMI sont plus élevées pour les *E. coli* O157 : H7 que pour les autres *E. coli.* La présence de colonies suspectes (sorbitol négatives) d' *E. coli* O157 : H7 sur SMAC doit être confirmée par

• un test d'agglutination latex réalisé directement sur la colonie suspecte pour vérifier la présence de l'antigène somatique O157 ;

• l'identification biochimique de l'espèce.

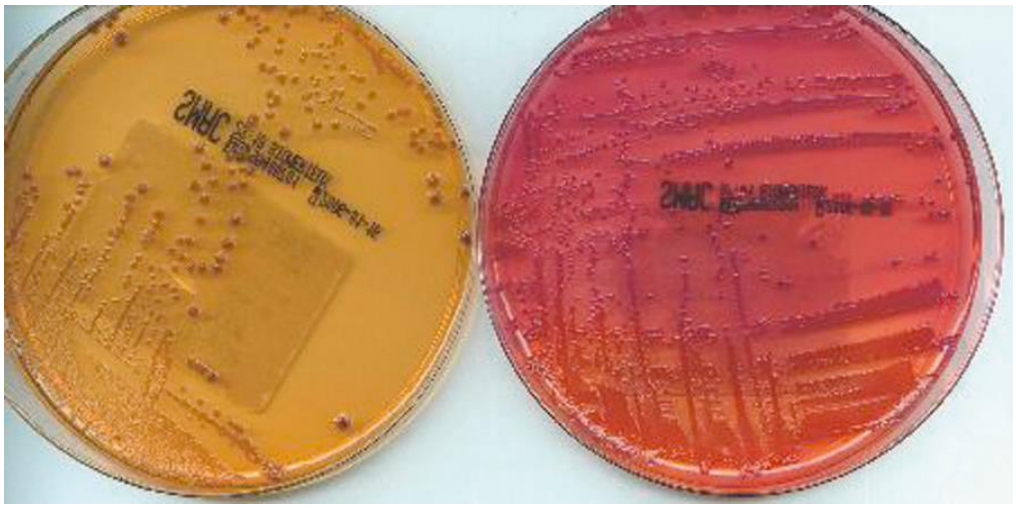


Figure 10: Aspect des colonies d'Escherichia coli O157 : H7 Colonies sorbitol – sur milieu SMAC – céfixime-tellurite ; à gauche, d'Escherichia coli sorbitol positif à droite (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2011a).

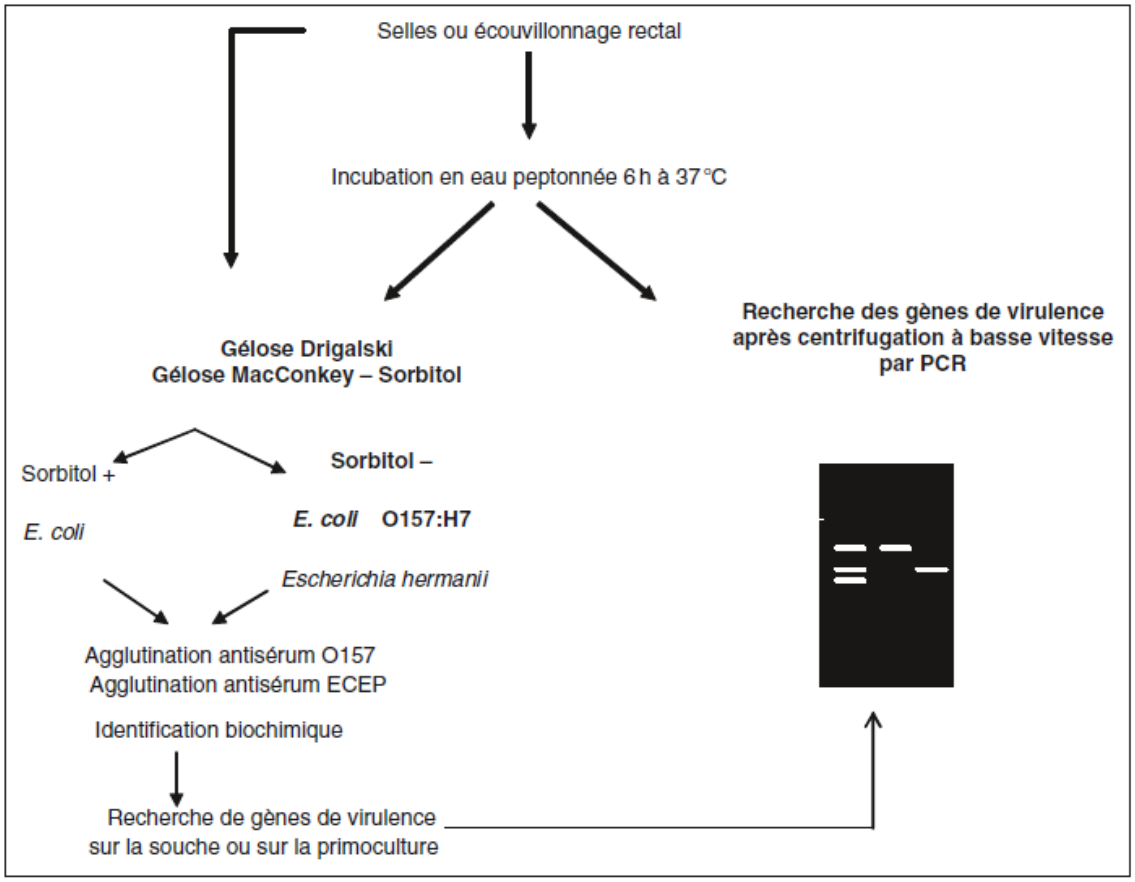


Figure 11: Principe de mise en évidence des EHEC dans les selles (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2011a).

Méthodes de détection des STEC non O157

Isolement : milieu Drigalski, Hektoen ou la Gélose au sang - enterohemolysin agar

- Agglutination des sérotypes « EPEC » classiques

- Mise en évidence des gènes de virulence

- PCR positive rond l'Isolement de la bactérie indispensable

- Etudes épidémiologiques moléculaires (Ribotypie, pulsotypie).

Sérum précoce et sérum tardif

- Mise en évidence des anticorps anti LPS de 25 serogroupes d'*E.coli* dont O157 : H7

- Ac de classe IgA, IgM, et IgG par techniques ELISA, immunoblotting, hémagglutination

Indispensable pour les études épidémiologiques lorsque la mise en évidence des STEC dans les selles est négative ou impossible et l'identification des autres sérogroupes STEC

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. "DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ' UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE." : 1–37.

Bingen, E. "Analyse Bactériologique Des Selles."

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. "Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire." *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. "Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes." *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE

Shigella

Bacille Gram négatif, les Shigelles sont ainsi nommées en l'honneur du bactériologiste japonais Kiyoshi Shiga (1870-1957) qui découvrit l'agent de la dysenterie bacillaire en 1897 au cours d'une grave épidémie au Japon.

Bien que faisant partie sur le plan génétique de l'espèce *Escherichia coli*, le genre *Shigella* a été conservé dans la taxonomie pour des raisons médicales

Escherichia coli entéro-invasif et *Shigella* formant d'ailleurs un même et unique pathovar *d'Escherichia coli*. Les shigelles appartiennent donc à la famille des entérobactéries et à l'espèce colibacille.

Ce sont des pathogènes strictes des humains et sont sous forme de courts bâtonnets de 2 à 3 µm de long, immobiles, aflagellés, non encapsulés. Leur température optimale de croissance est de 37°C en milieu aéro ou anaérobie. Elles sont peu résistantes en milieu extérieur, ne produisent pas de gaz lors de la fermentation du glucose et ne dégradent pas le glucose. Les Shigelles ont pour unique réservoir naturel le tube digestif de l'homme. On les trouve uniquement dans les selles des malades et des porteurs sains.

La propagation de *Shigella* s'effectue par voie féco-orale directe interhumaine du malade à son entourage par les mains sales .L'eau de boisson contaminée et les aliments souillés (lait, crèmes glacées, salades, produits carnés, etc.) par des déjections contenant *Shigella* représentent l'autre source traditionnelle de contamination, dite indirecte. 10 à100 bactéries (DI) peuvent déclencher une diarrhée chez un individu sain en raison notamment de leur résistance à l'acidité gastrique

2.1. Classification des shigelles

Le groupe shigelle est divisé en 4 sérogroupes avec près de 40 sérotypes. On cite :

_ *Shigella dysenteriae* responsable de diarrhées sévères et constitue le sous-groupe A (15 sérotypes).

_ *Shigella flexneri :* représentée par le sous-groupe B, elle semble moins virulente mais peut donner des diarrhées sévères (8 sérotypes et 15 sous-types);

_ *Shigella sonnei* symbolisé par le sous-groupe D à l'origine de diarrhées aiguës fébriles (1 unique sérotype) et

_ *Shigella boydii,* répandue en Asie du Sud-est de virulence intermédiaire entre *Shigella flexneri* et *Shigella sonnei.*

2.2. Structure antigénique

Les shigelles ne possèdent que les antigènes somatiques O. l'absence d'antigènes H est due à leur immobilité. Cet antigène O est essentiel au sérotypage des shigelles.

Elles sont difficilement identifiables par leurs seuls caractères biochimiques.

Leur identification formelle nécessite un sérotypage fondé sur les propriétés antigéniques lipopolysaccharidiques somatiques O.

2.3. Caractères biochimiques peu nombreux Lactose (-)

Pouvoir pathogène naturel**.**

Agents de syndromes dysentériques : diarrhées **sanglantes, mucopurulentes** et douleurs abdominales

Il existe de grandes variations dans la gravité des infections. La forme la plus sévère est la dysenterie bacillaire de Shiga Incubation de 24h

Début brutal : nausées, vomissement de bile, crampes abdominales, fièvre à 39°C, diarrhée aqueuse sans matières

Douleur abdominales + faux besoins : épreintes, ténesmes, Selles fréquentes : 20 à 30 /j. Déshydratation, Évolution : 12 à 18j avec guérison spontanée, Complications : péritonites, paralysie des membres.

Formes sévères : coma puis décès, (rare)

2.4. Pathogénie

a. **Pouvoir invasif** Invasion de la muqueuse colique

- **Invasine IpaD** penetration dans l'entérocyte
- **Invasine IpaB,IpaC** rupture de la vacuole de phagocytose et libération de la bactérie dans le cytoplasme. La bactérie se multiplie et acquiert une « mobilité » qui entraîne une dissémination de la bactérie vers les cellules adjacentes (**Ics: IcsA,Ics B** intracellular spread: ce sont les filaments d'actine polymérisés qui vont se fixer à l'extrémité de la bactérie créant une queue et propulsant la bactérie dans le cytoplasme (image de comète) un deuxième mouvement est celui de la bactérie le long des filaments d'actine qui conduit à la formation de microcolonies près du noyau

b. La toxine de Shiga

Libérée pendant la lyse de la bactérie (localisation périplasmique) PM: 70 kDa , protéine multimérique composée d'une sous-unité A catalytique de 32 kDa et de 5 SU B de fixation de 7,7 kDa Déterminisme chromosomique

Les SU B se fixent sur un glycolipide globotriosylcéramide (Gb3) puis la toxine est internalisée par endocytose. Puis un phagolysosome se forme dans lequel les enzymes lysosomiaux cliveront la SU A en A1. La SU A1 inhibe la synthèse des protéines en inactivant la SU 60S du ribosome par arrêt de la fixation des TRNA-AA arrêt de l'élongation des protéines.

- **Autres activités de la toxine de Shiga**

Effet neurotoxique (effet de paralysie chez le lapin après inj IV). Effet entérotoxique (accumulation de liquide hémorragique dans anses ligaturées intestinales de lapin).

- **Autres facteurs de virulence chez les *shigella***

Vérotoxine (toxine voisine de la toxine de Shiga)

Entérotoxines shiga-like

L'invasion des cellules de la muqueuse colique et les effets toxiques. Une forte réaction inflammatoire avec survenue d'ulcérations, formation d'abcès, des hémorragies se traduisant par des selles sanglantes et mucopurulentes.

3**. Diagnostic**

a. Direct :

Aspect des selles ; un frottis montrera la présence de nombreux polynucléaires

Coprocultures : ensemencement des selles sur milieu sélectif. Gélose salmonelle-shigelle: colonies incolores. Identification biochimique +typage pas de recherche du pouvoir invasif (test de Sérény).

Caractère d'identification

L'identification biochimique du genre *Shigella* pose principalement le problème du diagnostic différentiel avec une souche d'E. *Coli* lactose négatif et immobile. Les *Shigella* sont caractérisées par de nombreuses réactions négatives. L'origine de la souche la coproculture est un élément d'orientation capital. Les problèmes d'identification se posent essentiellement avec

les souches immobiles et agazogènes d' *E. coli*. *S. dysenteriae* type 1 est catalase négative, mais quelques souches d'autres types pourraient également être catalase négative.

Des antisérums polyvalents (pour *S. flexneri* , *S. boydii* et *S. dysenteriae*) ou monovalents (pour *S. sonnei* et *S. dysenteriae* de type 1) sont commercialisés pour l'identification en routine des shigelles.

Recherche de **vérotoxine** (test : agglutination de particules de latex sensibilisées)

b. *Indirect* : Sans intérêt sauf pour relier des états rhumatismaux à ***S.flexneri***

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. "DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ' UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE." : 1–37.

Bingen, E. "Analyse Bactériologique Des Selles."

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. "Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ' Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents." *Techniques*.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. "Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire." *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Lucas, F et al. 1991. "Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ' Action To Cite This Version :"

Vandepitte, J. "Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire."

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE

Yersinia

Généralités

1894 : isolement du bacille pesteux par Alexandre Yersin, à partir de bubons pestiférés et de cadavres de rats. Zoonose : transmise d'animal à animal par la puce. Eventuellement transmise à l'homme : hôte accidentel.

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois coccobacillaires de 0,5 à 0,8 µm 1 à 3 µm à Gram négatif présentant parfois une coloration bipolaire, non capsulés, non sporulés, immobiles à 37 °C et pour certaines espèces mobiles à 30 °C. Les bactéries appartenant à ce genre ont un développement optimal vers 30 à 32 °C, mais une virulence ne s'exprimant qu'à 37 °C. Les *Yersinia* sont actuellement rattachées aux *Enterobacteriaceae* avec les caractères oxydase négative, catalase positive, aéro anaérobies facultatifs, fermentation du glucose et le plus souvent réduction des nitrates en nitrites. Ce genre comporte actuellement trois espèces pathogènes principales : *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*.

▶ **Modes épidémiques**

Depuis le début de l'ère chrétienne, 3 grandes pandémies :

▶ 1ère pandémie : peste de Justinien (peste antique) VIe siècle : bassin méditerranéen > 100 millions de morts en 50 ans

▶ 2ème pandémie : « peste noire » ou pest médiévale XIVe siècle : Inde puis Europe 25 millions de morts (> 1/4 de la population européenne de l'époque)

▶ 3ème pandémie : Chine (1894) puis reste du monde

II. Habitat et pouvoir pathogène

Y. pestis est responsable de la peste. Le couple puce–rongeur constitue le réservoir, mais la bactérie survit plusieurs mois dans le sol ou les terriers. La puce transmet *Y. pestis* de rongeur à rongeur et accidentellement des rongeurs à l'homme.

III. Pouvoir pathogène

À partir de la piqûre, la multiplication bactérienne entraîne une nécrose tissulaire puis un bubon ou adénite pesteuse qui siège le plus souvent au niveau de l'aine, plus rarement au cou ou à l'aisselle, localisation dépendant du siège de la porte d'entrée

- **Phase d'invasion** : multiplication bactérienne, nécrose Phlyctène

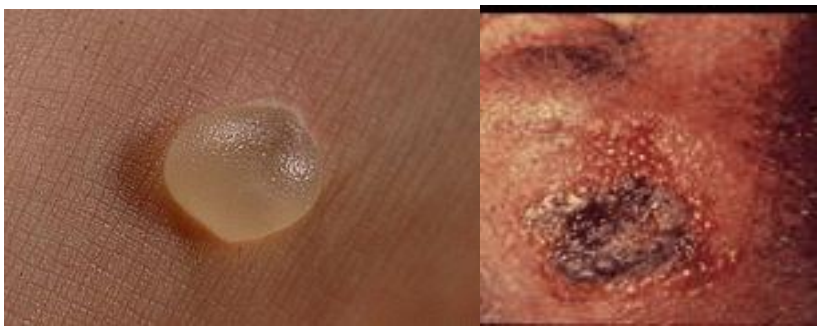


Figure 12: Phlyctène à gauche et charbon pesteux à droite (photo anonyme).

- **Phase d'état :**

La bactérie se dissémine précocement par voie lymphatique, provoquant la peste bubonique (Bubon = adénopathie) tuméfaction locale au niveau d'un ganglion satellite (axillaire, inguinal, crural ou cervical) dure et douloureuse. Cette **adénopathie** est accompagnée d'un **malaise général**, d'une **fièvre élevée** (40°C) et "en plateau", ainsi qu'à des troubles du comportement, signes cliniques associés à une septicémie.

▶ **Evolution :**

- septicémie, choc CIVD (La coagulation intravasculaire disséminée) Dans les cas graves, un **collapsus cardio-vasculaire** et des hémorragies par coagulopathie de consommation sont observés. Le plus souvent, la **mort** survient 3 à 5 jours après

- localisations secondaires : atteinte multi-viscérale (poumon, rate, foie).

- mortalité élevée (>70%) si pas de traitement précoce et adapté.

Parfois des formes septicémiques et pulmonaires. La transmission interhumaine est possible par les sécrétions broncho-pulmonaires provoquant des pestes pulmonaires qui est la forme **la plus contagieuse** du fait d'une transmission inter-humaine directe des bactéries. Conséquence d'une peste bubonique, elle peut cependant résulter de l'inhalation par un sujet sain de poussières souillées de déjections de puces infectées. Après une **brève phase d'incubation** (quelques heures à 2 jours), la maladie débute brutalement, réalisant une **pneumopathie avec fièvre** (40° C), **toux**, **hémoptysie**, **détresse respiratoire** et **altération profonde** de l'état général. La maladie évolue rapidement vers la mort avec une extension des

foyers pulmonaires, des troubles neurologiques (confusion mentale ou prostration), des **hémorragies sous-cutanées** et un **collapsus cardio-vasculaire**.

Diagnostic bactériologique direct

Prélèvements

Pour la peste, il faut rappeler que la culture doit être pratiquée dans une unité de haute sécurité (P3 ou P4). La recherche s'effectue à partir de ponction de bubon, d'expectorations, voire d'hémocultures Pour les yersinioses non pesteuses, la recherche est réalisée sur selles ou ganglions mésentériques. *Y. enterocolitica* peut persister dans les selles plusieurs semaines après la guérison et peut être aussi être retrouvé dans les selles dans les cas d'atteintes articulaires ou d'érythème noueux, ce qui n'est pas le cas pour *Y. pseudotuberculosis*.

Transport

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

3. Examen direct

Y. pestis est un petit bacille à Gram négatif pléiomorphe à coloration bipolaire que l'on peut voir sous forme capsulée sur frottis d'organe

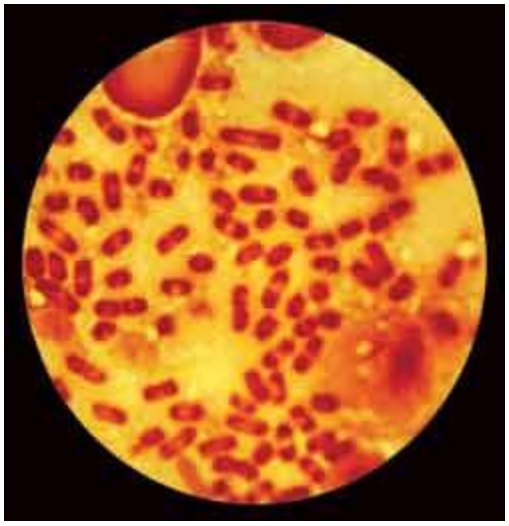


Figure 13: *Yersinia pestis* après coloration de Gram (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

4. Culture

Y. pestis se développe sur milieux gélosés usuels Drigalski, MacConkey, etc., et sur milieu sélectif CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine). La température optimale est de 25 à 28 °C et les colonies de petit taille à la limite de la visibilité apparaissent après 24 heures).le plus souvent après 48 heures sur milieu gélosé. En milieu liquide, le trouble est inhomogène avec un voile

en surface et un aspect floconneux en profondeur. Un des caractères importants est l'immobilité à 22 °C comme à 37 °C par manque de ciliature. La galerie « entérobactéries» doit être incubée à 28 °C, sauf pour uréase et ONPG, recherchées à 37 °C.

*** Identification du bacille de la peste**

- bacille immobile à 20°C et à 37°C (≠ autres *Yersinia*)

- fermentation du glucose sans production de gaz

- les recherches enzymatiques se font à 37°C

- ONPG +

- uréase : caractère inconstant, observées sur des souches fraîchement isolées

- nombreux caractères nég : indole, VP, H2S, LDC,ODC, ADH, CIT

*** Autres examens**

- Inoculation à l'animal

  injection sous-cutanée ---> abcès+bubon ---> décès

- sérologie : intérêt épidémiologique

La recherche de marqueurs épidémiologiques, sérotypie, lysotypie, ribotypage, etc., est du domaine de laboratoires spécialisés, de même que la recherche de facteurs de pathogénicité.

Yersinia enterocolitica et *Yersinia pseudotuberculosis*

Agents des yersinioses

▶ *Y.pseudotuberculosis* ; découverte en 1883 (cobaye), rôle en pathologie humaine démontré en 1954

▶ *Y.enterocolitica* : la plus fréquemment isolée 1ère description en 1939 cas humains de plus en plus fréquents

Zoonose : l'homme est un hôte accidentel

▶ Réservoir

- animaux sauvages : rongeurs, oiseaux

- animaux domestiques et d'élevage : porcs, bovins, chats.

Modes de contamination humaine

- directe : contact avec des animaux domestiques infestés ou des malades convalescents (selles).

Indirecte : intoxication alimentaire

(produits laitiers, charcuteries, légumes consommés crus...)

(Les *Yersinia* sont capables de croître à +4°, ce qui explique la fréquence des yersinioses malgré le respect de la « chaine du froid »).

Pouvoir pathogène de *Y.enterocolitica* et de *Y.pseudotuberculosis*

1/ Entérites (+ fréquente avec *Y. enterocolitica*)

- gastro-entérite aigue : fièvre, diarrhée prolongée (8 à 10 selles/jour), vomissements, douleurs abdominale (colon et fosse iliaque droite).

- processus entéro-invasif : polynucléaires et hématies à l'examen microscopique des selles.

- évolution prolongée sur 8 à 10 jours

2/ Adénite mésentérique (*Y. pseudotuberculosis*)

- mêmes signes sans la diarrhée.

- tableau d'appendicite : douleur aigue de la fosse iliaque droite, fièvre, vomissements

- volumineuses adénopathies mésentériques et appendice sain

Diagnostic bactériologique direct

On peut, pour les prélèvements polymicrobiens (selles, aliments, etc.), tenter un enrichissement durant plusieurs jours ou semaines à basse température (+ 4 °C) en milieu liquide (eau peptonée, tampon PBS). Soit directement, soit à partir du milieu liquide d'enrichissement, on va, pour les selles, utiliser des milieux sélectifs pour coproculture, incubés à 30 °C :

• milieux contenant des sels biliaires (MacConkey, Hektoen, Wauters, SS, DCL) ; milieu sélectif (CIN). Sur CIN, les colonies sont petites (0,5 mm) en 24 heures, pour atteindre 2 à 3 mm en 48 heures, avec un centre rouge foncé caractéristique

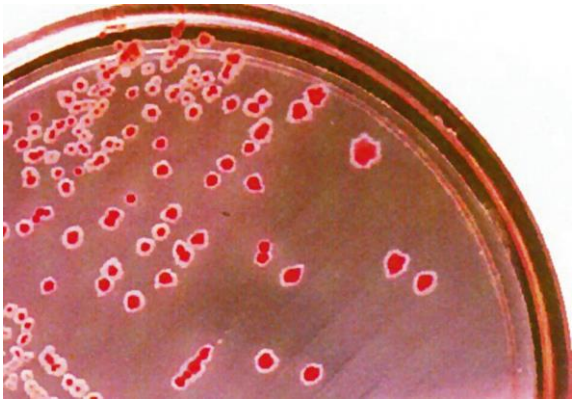


Figure 14: Aspect des colonies *d'Y. enterocolitica* sur gélose CIN. (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

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

En dehors des caractères généraux des entérobactéries, on peut être orienté par une mobilité à 25 °C (par ciliature péritriche) et une immobilité à 37 °C, des caractères TDA/ PDA négatifs (ce qui permet une différenciation avec les *Proteus*), un test ONPG positif sans que les souches possèdent une β -galactosidase, des caractères LDC –,ADH –. La galerie « entérobactérie » permet de confirmer l'espèce (*Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*). On différencie ces deux espèces notamment sur les caractères ODC, VP et saccharose, négatifs pour *Y. pseudotuberculosis* , positifs pour *Y. enterocolitica* . Pour la caractérisation des sérovars au sein des antigènes O, on dénombre pour *Y. pseudotuberculosis* 8 sérogroupes (I à VIII) et pour *Y. enterocolitica* sensu stricto plus de 29 antigènes O.

Sérodiagnostic

▶ utile au diagnostic lors de manifestations extra-digestives

▶ agglutination de suspensions bactériennes

▶ analyse de la cinétique des anticorps (2 serums à 15 jours d'intervalle). Augmentation des anticorps : 1 semaine après le début des symptômes. Sommet : 2eme semaine de la maladie.

▶ peu spécifique : communautés antigéniques entre certains sérotypes de *Yersinia*, *Brucella*, *Salmonella* -> réactions croisées

Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques de *Y. pestis* , à la streptomycine, la tétracycline, le chloramphénicol, molécules couramment utilisées dans les traitements curatifs, est classique. Sur antibiogramme standard, on observe habituellement pour *Y. pseudotuberculosis* une

sensibilité aux β -lactamines, aminosides. En revanche, *Y. enterocolitica* est naturellement résistant à l'ampicilline et amoxicilline + acide clavulanique, à la ticarcilline et aux céphalosporines de 1 re génération par production d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase. Les souches sont sensibles aux céphalosporines de 3 e génération, aux aminosides et aux fluoroquinolones.

Conclusion

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

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. “DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ’ UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE.” : 1–37.

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. “Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ’ Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents.” *Techniques*.

Lucas, F et al. 1991. “Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ’ Action To Cite This Version :”

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen Les2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”

‘

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE

(*VIBRIO CHOLERAE*)

Généralités

Agent infectieux du choléra, le Vibrion cholérique est une bactérie appartenant à la famille des *Vibrionaceae*, genre *Vibrio*, espèce *Vibrio cholerae*. Il a été pour la première fois isolé comme le responsable du choléra par l'anatomiste italien Filippo Pacini en 1854. Ce sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés, assez courts (1,5 à 3,0 µ m), parfois franchement cocobacillaires. Ils sont mobiles par ciliature polaire, le plus souvent monotriche, en milieu liquide. Des formes immobiles ont récemment été observées. Les *Vibrio* n'ont pas d'exigence nutritive particulière si ce n'est l'halophilie de certaines espèces. Les températures de culture vont de 18 à 38 °C et le pH permettant la culture va de 6 à 9. Le métabolisme est oxydo-fermentatif, le glucose étant fermenté sans gaz. La majorité des souches est oxydase positive (sauf *V. metschnikovii*).



Figure 15: Aspect typique incurvé de *Vibrio cholerae* (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

Ce genre bactérien comprend plus de 90 espèces, ayant essentiellement pour habitat le milieu marin et, plus particulièrement, les eaux côtières et estuariennes.

Pendant plus d'un siècle, près de 200 sérogroupes ont été identifiés, seuls connus comme étant responsables de choléra, deux biotypes *cholerae* et *El Tor* et ses trois sérotypes Inaba, Ogawa et Hikojima. À la fin de 1992, sont apparus des choléras dus à des souches *V. cholerae* O139 dites « Bengale » car les premières épidémies se sont déclarées au Bengladesh.

Parmi les autres espèces de vibrions qui peuvent être retrouvées chez l'homme, on trouve :
• *V. parahaemolyticus* , agent de diarrhées aiguës chez l'homme après ingestion de fruits de mer contaminés, les symptômes survenant souvent 2 à 6 heures après le repas ;

Tableau 2 : *Vibrions cholériques (Vibrio cholerae O1 et Vibrio cholerae* O139) et principaux vibrions non cholériques d'intérêt médical

Espèce	**Classement selon l'antigène O**	**Classement selon le biotype****	**Pouvoir pathogène**
Vibrions cholériques			
Vibrio cholerae	Sérogroupe O1	Classique	Responsable des 5 eme et 6 eme pandémies
		El Tor	Responsable de 7 eme pandémie
	Sérogroupe O139	(non décrit)	Responsable d'une 8 eme pandémie ?
Vibrions non cholériques			
Vibrio cholerae	Sérogroupes		Gastro-entérites
	Non-O1, Non-O139		Suppurations
	(≥200 sérogroupes)		Septicémies
Vibrio parahaemolyticus			Gastro-entérites
Vibrio vulnificus			Suppurations, Septicémies

Il se développe mieux à pH alcalin et appartient aux deux groupes antigéniques O1 et O139.

Il se distingue aisément des espèces de la famille des entérobactéries par la présence d'un cytochrome oxydase et d'une mobilité polaire à l'état frais. Ce sont des germes ayant une survie de 50 jours dans l'eau de mer à 5-10°c et de 10 à 13 jours à 30 -32°c. Les vibrions persistent dans la nature et ont ainsi été retrouvés en zone d'endémie, des mois voire des années après une épidémie.

Habitat et pouvoir pathogène

L'espèce *V. cholerae* , strictement humaine, est éliminée en quantité dans les selles des malades atteints de choléra jusqu'à 10 6 à 10 8 vibrions/ml de selles) et ne persiste dans l'environnement que de manière éphémère car c'est une bactérie assez fragile. Les souches

toxinogènes de *V. cholerae* sont responsables du choléra humain qui peut revêtir différents aspects plus ou moins graves, dominés par un début brutal avec une diarrhée massive et émission de selles afécales « eau de riz », pouvant atteindre 10 à 50 selles par jour (3 à 15 l éliminés par 24 heures), accompagnées fréquemment de vomissements sans fièvre. Il existe des formes moins graves et d'autres atypiques. L'incubation après contamination directe (mains sales) ou indirecte (aliments) dure de quelques heures à 5 jours. Le choléra entraîne une mortalité de 1 à 5 % ; en l'absence de traitement, celle-ci peut dépasser 50 %. Les souches de *V. cholerae* non toxinogènes peuvent être retrouvées dans des diarrhées, souvent plus bénignes, mais parfois avec des localisations extradigestives.

I. Structure antigéniques

Vibrio cholerae possède à sa surface l'antigène somatique O constitué par le lipopolysaccharide. La nature de cet antigène permet de décrire actuellement plus de 155 sérogroupes, pouvant être identifiés dans les centres de référence à l'aide d'anticorps spécifiques. Antigène flagellaire H (*Ag H)*: L'antigène flagellaire n'a pas d'intérêt. Seuls les bacilles des groupes O1 et O139 sont considérés comme des « vibrions cholériques » capables de donner un choléra épidémique

Pathogénicité

1. Substances pathogènes:

Flagelles, pili et la musinase

Entérotoxine cholérique. L'unité B est responsable de la combinaison avec le récepteur de ganglioside GM1, elle permet à l'unité A de traverser la membrane cellulaire. L'unité A toxique peut activer l'adényl-cyclase. La concentration élevée d'AMP cyclique provoque des perturbations du transit de l'eau et des ions à travers la membrane des cellules intestinales.

Après ingestion, les germes franchissent l'estomac, s'implantent dans l'intestin grêle sans traverser la paroi. Ils produisent des entérotoxines qui provoquent une diarrhée profuse et de vomissements incoercibles. Responsable d'une déshydratation sévère avec baisse de la tension artérielle et d'une déperdition en ions avec acidose métabolique. la mortalité est élevée : 50 à 75 %.

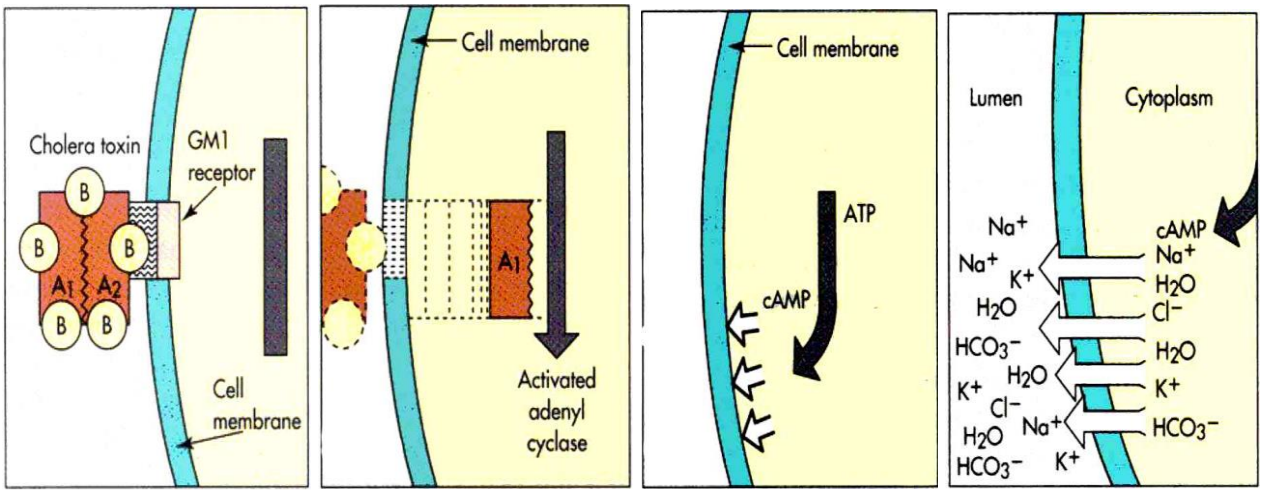


Figure 16: mécanisme physiopathologique de vibrio cholerae o1 ou o139 (Des et al. n.d.).

L'immunité

Après infection, le malade acquiert une immunité solide et durable. Quelques jours après le début de l'infection, l'anticorps de type IgG et IgM apparaît dans le sang et IgA sécrétoire dans la cavité intestinale.

Diagnostic microbiologique

Prélèvements

Les selles, les vomissements constituent le prélèvement majeur en cas de suspicion de choléra ou d'atteinte digestive due à un *Vibrio*. Elles sont recueillies dans un récipient stérile étanche, le plus tôt possible au cours de la maladie, avant tout traitement antibiotique et transportées en sachet scellé, clairement identifié. Dans certains cas – suspicion de « choléra sec » –, on peut être amené à pratiquer un écouvillonnage rectal.

Si l'examen est différé pour des raisons d'intendance, il est conseillé de pratiquer sur place un ensemencement en eau peptonée salée (2 % NaCl) et alcaline (pH 9) et d'adresser le tube à vis au laboratoire en même temps que la selle dans un emballage aux normes en vigueur. Il est également possible d'utiliser comme milieu de transport le milieu de Cary-Blair. Il est aussi possible d'imprégner du papier filtre avec

Les selles ; ce système permet de conserver viables les souches de *Vibrio* pendant 5 semaines. Dans le cas de manifestations autres que la symptomatologie digestive, divers prélèvements peuvent être effectués (hémocultures, prélèvements cutanés, pus profonds, liquides de ponction, etc.). Les échantillons d'eaux, d'aliments doivent être recueillis dans des flacons stériles contenant du chlorure de sodium et gardés à +4 °C avant analyse réalisée dans

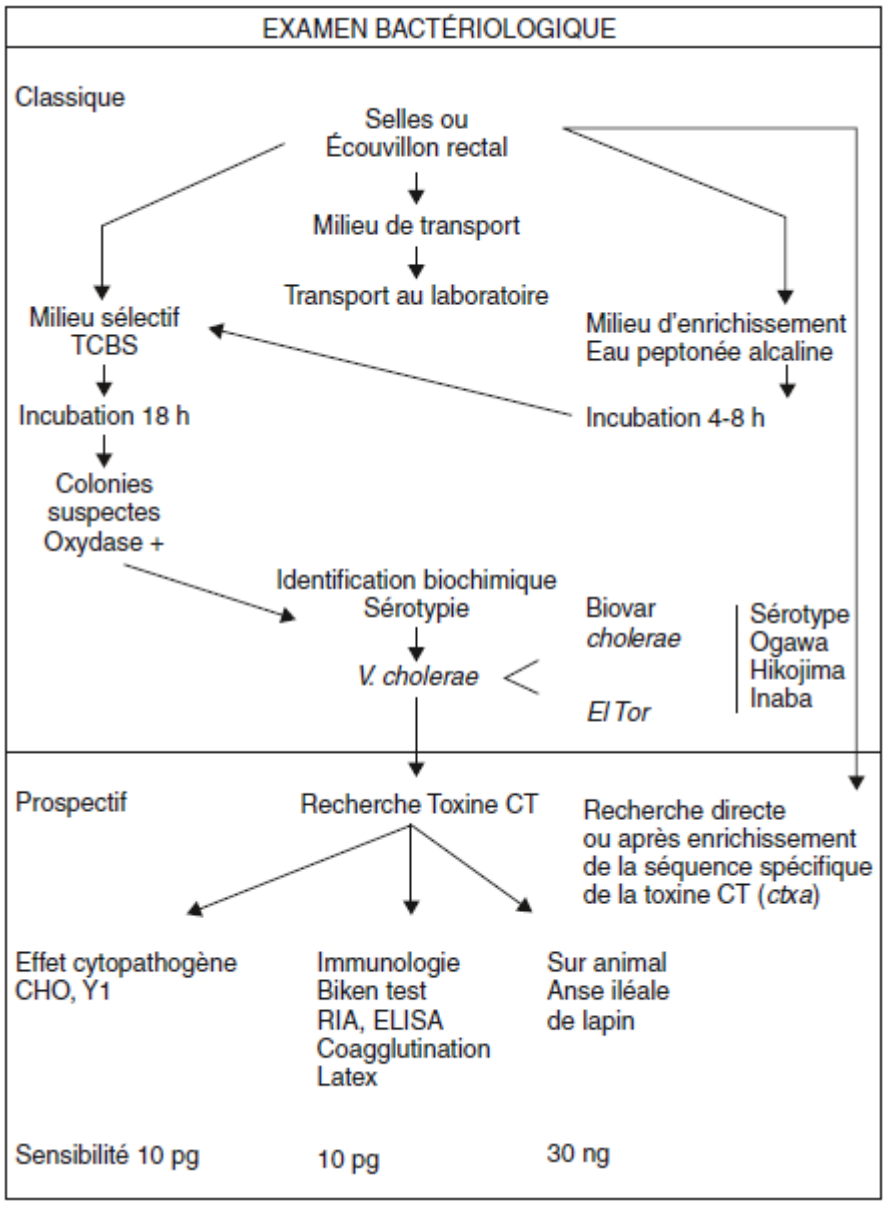
les 8 à 12 heures. L'eau devra être filtrée à travers une membrane de 0,45 □□m et déposée sur milieu sélectifs TCBS (thiosulfate de sodium-citrate de sodium-bile de boeuf-saccharose).

Examen de l'échantillon

Les selles cholériques sont afécales avec un aspect riziforme. Au microscope à l'état frais, on observe du mucus, pas de leucocytes, mais une flore monomorphe de bacilles incurvés mobiles qui apparaissent Gram négatif après coloration. Il existe une technique d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux anti-O1 permettant une identification de *V. cholerae* O1, mais cela est réservé à quelques laboratoires spécialisés. La morphologie, notamment à partir des cultures, peut être atypique et prendre l'aspect de sphéroplastes.

a. Examen de l'échantillon

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



.

Figure 17: Étapes du diagnostic bactériologique direct de *Vibrio cholerae* : diagnostic classique et prospectif (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

Mise en culture

Il est conseillé d'ensemencer en parallèle des milieux d'enrichissement et d'isolement :

• enrichissement en milieu liquide :

• Eau peptonée alcaline à 1 % et 3 % de NaCl ; ou

• milieu taurocholate-tellurite-peptone.

Ce milieu d'enrichissement sera repiqué sur milieu solide d'isolement après 6 à 8 heures d'incubation à 37 °C.

La culture en milieu liquide est caractéristique et forme un voile à la surface du milieu.

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

• peu sélectifs : gélose nutritive avec 0,1 % de Teepol, gélose trypticase soja alcaline (pH 9), gélose. Mueller-Hinton, qui peut également servir pour tester l'activité amylasique sélectifs : gélose TCBS sur laquelle les colonies saccharose positives apparaissent en jaune (c'est le cas de *V. cholerae*) et négatives en vert



Figure 18: Aspect des colonies de *Vibrio cholerae* sur milieu TCBS (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

Diagnostic direct

Identification présomptive

Cinq colonies suspectes différentes seront étudiées. Sur milieu TCBS, elles apparaissent comme de grandes colonies jaunes convexes. Leur coloration tend au vert si l'incubation est prolongée au-delà de 24 heures. L'orientation du diagnostic se fera sur l'aspect au Gram où les bactéries apparaissent fréquemment coccobacillaires et sur la mobilité. On pourra tester vibriostatique 0/129 et polymyxine sur milieu de Mueller- Hinton ; les souches 0-1 sont généralement sensibles au vibriostatique et les 0-139 résistantes. La réaction d'oxydase pourra être tentée. Une agglutination directe sur lame avec chacun des deux sérums anti-O-1 et anti-O-139 sera alors pratiquée. Si ce test est négatif, il faudra reprendre l'agglutination après chauffage de la suspension bactérienne 2 heures à 100 °C. En période épidémique, ces quelques tests peuvent être suffisants.

b. Identification biochimique :

L'utilisation de galeries prêtes à l'emploi telle la galerie API 20 E® permet d'obtenir des résultats satisfaisants à condition de réaliser la suspension bactérienne en solution à 1 % de NaCl. On peut aussi utiliser des galeries API 32 GN® ou API ID 32 E®. Cela permet de

confirmer le diagnostic de *Vibrionaceae* , puis d'espèce *V. cholerae*. La différenciation entre les biovars *cholerae* classique et *El Tor* repose sur les caractères indiqués dans le tableau2. En pratique, cela se limite à la détermination de la sensibilité à la polymyxine.

Tableau 3: Diagnostic différentiel entre les biovars cholerae et El Tor.

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

c. Identification sérologique :

les souches de sérogroupe O-1. Ce sérogroupe O-1 comporte trois spécificités antigéniques (A, B, C) aussi bien pour le biovar classique que pour le biovar *El Tor*, la combinaison de ces antigènes aboutissant à l'individualisation de trois sérotypes (BD Bioscience). Les sérotypes Ogawa et Inaba sont les plus fréquents.

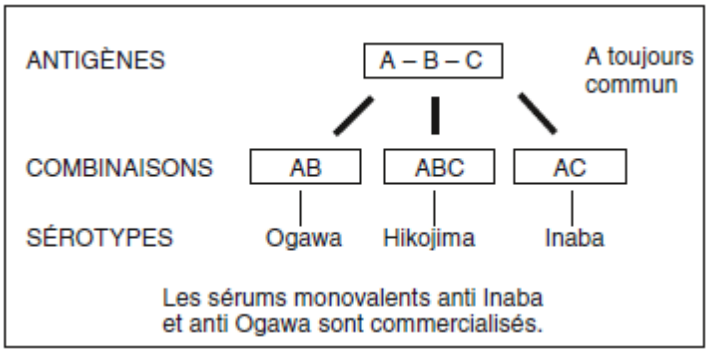


Figure 19: Sérotypes de Vibrio cholerae (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

Mise en évidence de la toxine cholérique (CT)

La toxine cholérique peut classiquement être mise en évidence par des techniques in vivo comme l'anse intestinale ligaturée chez le lapin ou sur culture de cellules (cellules Y1 ou cellules rénales de hamster chinois). De même, sur souche de *V. cholerae* , on peut rechercher la toxine par méthode immunologique, mais un test ELISA utilisant le ganglioside GM1 pour la recherche de CT

Mise en évidence de la toxine cholérique (CT)

La toxine cholérique peut classiquement être mise en évidence par des techniques in vivo comme l'anse intestinale ligaturée chez le lapin ou sur culture de cellules (cellules Y1 ou cellules rénales de hamster chinois). De même, sur souche de *V. cholerae* , on peut rechercher la toxine par méthode immunologique (immunodiffusion radiale- Bicken test), mais un test

ELISA utilisant le ganglioside GM1 pour la recherche de CT et aussi de la toxine LT d' *E. coli* , de même qu'un test d'agglutination au latex ont été proposés – ils ne sont pas disponibles en France. En fait, en plus des techniques classiques de diagnostic du choléra par isolement et identification de la souche, les techniques de biologie moléculaire permettent la recherche de la toxine sur la souche mais aussi dans les selles par amplification génique et détection du gène de la sousunité A de la toxine (*ctx* A). La technique d'amplification par PCR du gène codant la toxine s'est avérée plus sensible que les autres méthodes de détection de la CT.

Traitement prophylactique et curative

un vaccin tué.

- ✓ 50% sont protégés.
- ✓ l'immunité est de courte durée.
- ✓ recherches vers une immunisation par anatoxine ou par extraits purifiés.

▶ La réhydratation et la correction de l'acidose constituent l'essentiel du traitement.

▶ L'antibiotherapie n'est pas à négliger. La tétracycline est efficace**.**

Vibrio parahémolyticus

bactéries halophiles, gram négatifs, mobiles, en forme de virgule. Ils peuvent pousser en milieu ordinaire hypersalé. La concentration optimale de chlorure de sodium est de 3.5%.

Pathogénicité

Intoxications alimentaires les hémolysines thermostables élaborées constituent la base matérielle consécutive à l'ingestion de crustacés ou poissons. les prélèvements doivent être ensemencés en double comme indiqué pour *V. cholerae* (milieu d'enrichissement, milieu sélectif : TCBS), l'eau peptonée salée étant repiquée au bout de 6 à 8 heures sur milieu solide. L'incubation des milieux se fait à 30 °C avec observation en 48 heures de colonies bleu-vert sur TCBS. Les vibrions apparaissent très mobiles. Les souches tolèrent 7 à 8 % de NaCl.

Références

Bébéar, C, and C M Bébéar. “C. Bébéar, C.M. Bébéar.”

Bingen, E. “Analyse Bactériologique Des Selles.”

Leishmanioses, L E S. 2012. “Pour l ’ Obtention Du Doctorat En Pharmacie.” *These*.

Lucas, F et al. 1991. “Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ’ Action To Cite This Version :”

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. “Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes.” *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen. 2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Martin, C., and F. Denis. 2011. “Mycobactéries.” *Bactériologie Médicale* 3: 507–35.

Ploy, M.-C., and F. Denis. 2011. “Orientation Générale.” *Bactériologie Médicale*: 283–85.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Dr.Yahia FARES de MEDEA
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

LES BACTERIES PATHOGENES D'ORIGINE HYDRIQUE

Legionella

Introduction

La légionelle est une bactérie del'environnement et prolifère dans les eaux tièdes et les endroits tièdes et humides.

La légionellose est une forme de pneumopathie grave et parfois mortelle, provoquée par la *Legionella pneumophila*, et parfois par d'autres espèces de légionelles.

La découverte des légionelles remonte à 1976 par Marc Dade et son équipe à la suite d'une très longue et spectaculaire enquête, lorsqu'une épidémie de pneumonies aiguës frappa un groupe d'anciens combattants appartenant à l'American Legion réunis en congrès à Philadelphie, six mois plus tard – en 1977 – que l'agent causal fut identifié. C'était une bactérie propagée par le système de climatisation ; elle reçut le nom de Legionella pneumophila et la pathologie celui de « maladie des légionnaires ».

Taxonomie

La classification officielle proposée par le Center for Diseases Control (CDC) distingue le seul genre *Legionella* dans la famille des *Legionellaceae.* La classification de l'International Committee on Systematic Bacteriology propose trois genres : *Legionella, Fluoribacter* et *Tatlockia.*

À ce jour, on distingue 50 espèces et 64 sérogroupes, mais ces chiffres sont en constante évolution. L'espèce type est *Legionella pneumophila* subsp. *Pneumophila* qui compte 15 types antigéniques. Il existe deux autres subsp. : *fraseri* et *pascuelli* .

Caractères bactériologiques

Les légionelles sont des bacilles à Gram négatif qui prennent mal le Gram et sont colorés par cette technique uniquement si on utilise de la fuchsine phéniquée basique. Ce sont des bacilles non sporulés, non capsulés, de 0,3 à 0,9 µm de large sur 2 à 20 µm de long. Ils sont

cocobacillaires à l'examen direct et prennent un aspect morphologique. Plus filamenteux en culture.

Les légionelles sont mobiles pour la quasi-totalité des espèces, aérobies strictes avec des exigences nutritives en L-cystéine et en fer.

La température optimale de croissance varie de 25 à 37 °C. Les bactéries peuvent survivre à des températures inférieures à 25 °C et se multiplier jusqu'à 45 °C. L'aspect des colonies est caractéristique, en « verre fritté », à la loupe binoculaire.



Figure 20: Vue à la loupe, l'aspect en verre brisé (Denis, Bidet, and Bingen 2011)

.

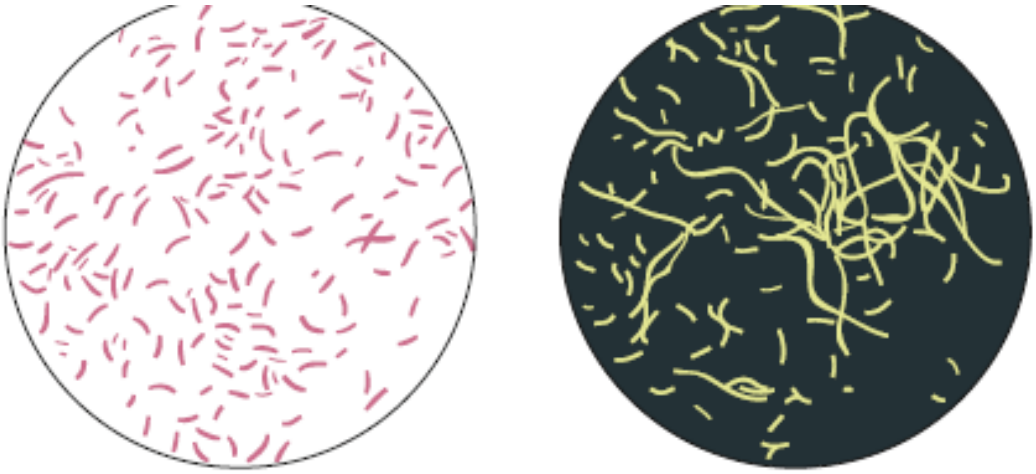


Figure 21: Morphologie des légionelles vues au microscope (coloration de Gram à la fuchsine phéniquée à gauche et immunofluorescence à droite) (Denis, Bidet, and Bingen 2011)..

III.b. Habitat et pouvoir pathogène

Les légionelles sont des germes hydrotelluriques qui affectionnent l'eau, surtout l'eau stagnante, de préférence tiède. Elles sont détruites lentement à 50 °C (quelques heures) et plus rapidement à 60 °C (quelques minutes).

Les réservoirs naturels des légionelles sont nombreux : lacs, rivières, puits, eau de pluie stagnante, mais aussi sols et composts humides. Les gîtes de prédilection restent les tours aéroréfrigérantes, l'eau chaude des stations thermales ou l'eau chaude sanitaire. Sa présence est favorisée par la température (25 à 45 °C), mais aussi par certains facteurs physicochimiques (dépôts organiques, nature des réseaux, stagnation de l'eau, etc.) et la présence d'autres micro-organismes (biofilm, cyanobactéries, amibes libres, etc.).

III.c. Transmission

• La voie de transmission la plus communément admise est l'inhalation d'aérosols infectieux capables d'atteindre l'alvéole pulmonaire. Aussi la voie digestive (ingestion d'eau souillée).

• L'existence de porteurs sains et de contaminations inter-humaines n'a encore jamais été documentée.

• Après pénétration de l'arbre bronchique profond, les légionelles se multiplient dans les macrophages alvéolaires. Par action enzymatique de la bactérie, les phagosomes éclatent et libèrent les légionelles qui envahissent les pneumocytes et provoquent une alvéolite fibrillo-purulente.

I. Aspect clinique

La maladie se présente sous plusieurs formes :

• la maladie des légionnaires est la forme « classique » qui se manifeste par une pneumopathie fébrile, qui débute de manière plus ou moins progressive après une phase d'incubation, dont la durée classiquement admise est de 2 à 10 jours. Il peut y avoir aussi des manifestations extrapulmonaires : douleurs musculaires, anorexie, troubles digestifs (diarrhées), troubles psychiques, etc. Le tableau clinique peut être atypique, surtout dans les formes graves. Les pneumopathies à légionelles représentent entre 0,5 à 5 % des pneumopathies communautaires. Elles évoluent en cas sporadiques ou en cas groupés les manifestations extrapulmonaires sont rares, mais des cas ont été documentés chez des patients immunodéprimés. La pathologie est variée : cellulites, sinusites, péricardites, pyélonéphrites, péritonites, pancréatites, endocardites, abcès rectal, etc. Des infections du site opératoire après chirurgie cardiothoracique ont été décrites et la source de contamination reliée à de l'eau contaminée par des légionelles.

- **La fièvre de Pontiac :** est la forme bénigne de la maladie. Elle atteint les voies aériennes supérieures après une incubation courte (36 heures) et guérit spontanément. Elle passe souvent inaperçue ;

Prélèvements

V.a. chez l'homme

Chez l'homme, il n'y a pas de portage « sain ». La mise en évidence de la bactérie dans un prélèvement d'origine humaine signe la maladie.

• Les prélèvements d'urines permettent un diagnostic rapide par la recherche des antigènes solubles de *Legionella pneumophila*

• Les prélèvements pulmonaires : le succès de la culture dépend de la qualité du prélèvement. Le liquide bronchoalvéolaire (LBA) et les aspirations trachéales et bronchiques sont les prélèvements à privilégier. Il ne faut pas négliger pour autant les crachats, même si le prélèvement ne contient pas de polynucléaires.

• D'autres prélèvements ont également permis l'isolement de légionelles : biopsie pulmonaires, liquide pleural, sang, etc. voire des prélèvements issus de localisations extrapulmonaires (coeur, foie, rate, rein, peau, ……etc.).

Ces prélèvements doivent être faits si possible avant antibiothérapie. Ils sont recueillis le plus stérilement possible en évitant l'utilisation d'anesthésiques locaux (lidocaïne). Si le délai de transport est supérieur à 30 minutes, il est conseillé de conserver le prélèvement à +4 °C. Si le délai d'ensemencement est supérieur à 3 jours, les prélèvements doivent être congelés (–20 °C).

V.b. Dans l'eau

- Pour les eaux froides, un résultat négatif n'est pas significatif.
- En effet, plus de 99 % des légionelles sont viables mais non cultivables.
- Le seuil de détection de la méthode est de 50 UFC par litre d'eau.

V.c. Dans l'air

- Dans l'air, les méthodes sont fondées sur la PCR après aspiration de l'air et passage sur différents types d'impacteurs.
- Il a été mesuré à proximité de douches environ 103 UFC/m

Diagnostic biologique

VI.a. Recherche d'antigènes urinaires

C'est une méthode rapide de diagnostic qui se fait par (ELISA) en quelques heures ou par immunochromatographie sur membrane, de performance identique aux kits ELISA, mais qui permet un résultat plus rapide (lecture après 15 minutes). Ce test permet le diagnostic de plus de 80 % des légionelloses dues à *L. pneumophila* de sérogroupe 1 (Lp1) car les tests actuels permettent essentiellement la détection de ce sérogroupe. Un test négatif ne doit donc pas exclure le diagnostic de légionellose (sensibilité 56 %, spécificité 99 %).

VI. b. Culture

C'est la méthode de choix (le « gold standard ») qui seule permet de comparer des souches humaines et environnementales et de confirmer la source d'une infection. La spécificité est de 100 %, mais la sensibilité est faible (40 à 60 %).

Aucun prélèvement ne doit être rejeté sur les critères de la bactériologie classique, en particulier les crachats (quantité de polynucléaires, petit volume, etc.), car l'expérience prouve que même des prélèvements de « mauvaise» qualité peuvent donner des résultats positifs : une seule colonie suffit pour confirmer le diagnostic. (Figure 02)

VI.b. 1. Milieux de culture

Seuls des milieux spécifiques complexes (extrait de levure, L-cystéine, pyrophosphate de fer, charbon qui donne une coloration noire au milieu, antibiotiques, facteurs de croissance) permettent la croissance de la bactérie.

Pour les prélèvements humains, on utilise le *buffered charcoal yeast extract* (BCYE alpha) incubé à 35 °C sous 2,5 à 5 % de CO_2 . Ce milieu peut être rendu sélectif par l'adjonction d'antibiotiques (colistine et vancomycine).

Pour les prélèvements d'environnement, on utilise un milieu BCYE supplémenté en vancomycine, glycine et colistine (GVPC).

VI.b. 2. Préparation de l'échantillon

Les prélèvements peuvent nécessiter une préparation avant ensemencement :

• les crachats doivent être fluidifiés ;

• les échantillons liquides peuvent être centrifugés ;

• les tissus (biopsie et post mortem) doivent être broyés dans de l'eau stérile et homogénéisés.

Dans le cas d'une contamination bactérienne importante, un traitement de l'échantillon est recommandé :

• par traitement acide (HCl 0,2 M) suivi d'une neutralisation (KOH ou NaOH 0,01M) ;

• ou par chauffage 30 minutes à 50 °C (sélection des légionelles thermotolérantes);

• ou par dilution (10^{-2}, 10^{-4}) dans l'eau stérile pour diminuer la concentration en contaminants et en antibiotiques potentiellement présents.

VI.b. 3. Ensemencement

Tous les prélèvements non traités et traités sont ensemencés sur les milieux spécifiques :

• un milieu BCYE alpha ;

• un milieu supplémenté en antibiotiques, en sachant que ce milieu ne doit jamais être utilisé seul car il peut inhiber la croissance de certaines espèces de légionelles comme *L. micdadei* ;

• les milieux standards pour le prélèvement concerné.

VI.b. 4. Incubation

Les milieux sont incubés à 36 °C + ou - 1 °C, de préférence en présence de CO 2 (2,5 %).

Les milieux sont observés à J3, J5 et J10.

Si une contamination bactérienne est constatée dans les premières 24 heures de culture, le prélèvement peut être acidifié et réensemencé.

VI.b. 5. Identification

L'exigence en L-cystéine est un élément fondamental car, dans la grande majorité des cas, en primoculture, les légionnelles poussent uniquement sur milieu BCYE.

Les colonies ont un aspect typique en « verre fritté » quand on les observe à la loupe binoculaire (idéalement en lumière rasante) (figure 04).

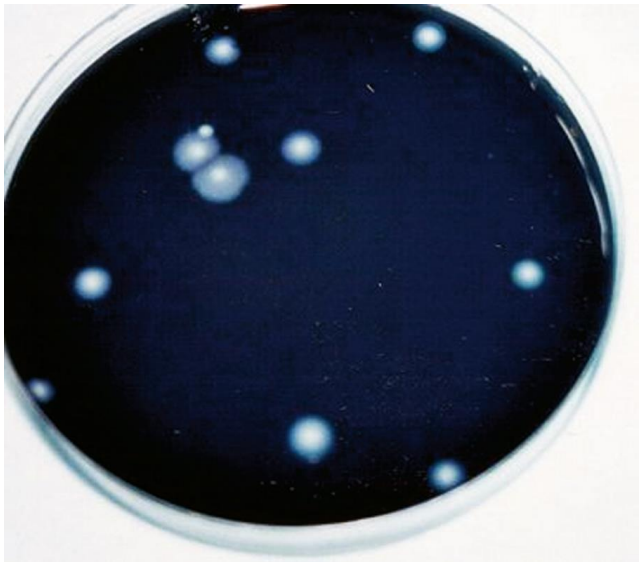


Figure 22: Culture de légionelles : aspect des colonies (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

Les colonies suspectes sont prélevées et ensemencées sur BCYE avec et sans cystéine et sur gélose au sang.

Le genre légionelle est retenu sur les arguments suivants :

• aspect typique des colonies sur BCYE alpha ;

• absence de culture sur milieu BCYE sans cystéine (sauf pour *L. jordanis* et *L. oakridgensis*) ;

• absence de culture sur gélose au sang

• morphologie évocatrice du Gram et en immunofluorescence

Les caractères biochimiques d'identification sont relativement pauvres et, en pratique, devant une colonie suspecte, on peut effectuer :

• une galerie API 20® : tous les caractères sont négatifs, sauf la gélatinase pour les principales espèces ;

• l'oxydase et la catalase (négative seulement pour *L. worsleiensis*) ;

• des tests de l'hydrolyse de l'hippurate, de β –lactamase et un test à l'amidon (positif).

Le diagnostic différentiel entre *L. pneumophila* et les autres espèces est possible :

• soit par immunofluorescence directe à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de la membrane externe (*major outer membrane protein* [MOMP]) présente chez tous les sérogroupes de *L. pneumophila* et qui serait spécifique de cette espèce ;

• soit par agglutination de particules de latex qui permet de détecter *L. pneumophila* sérogroupe 1 ou *L. pneumophila* sérogroupes 2 à 14

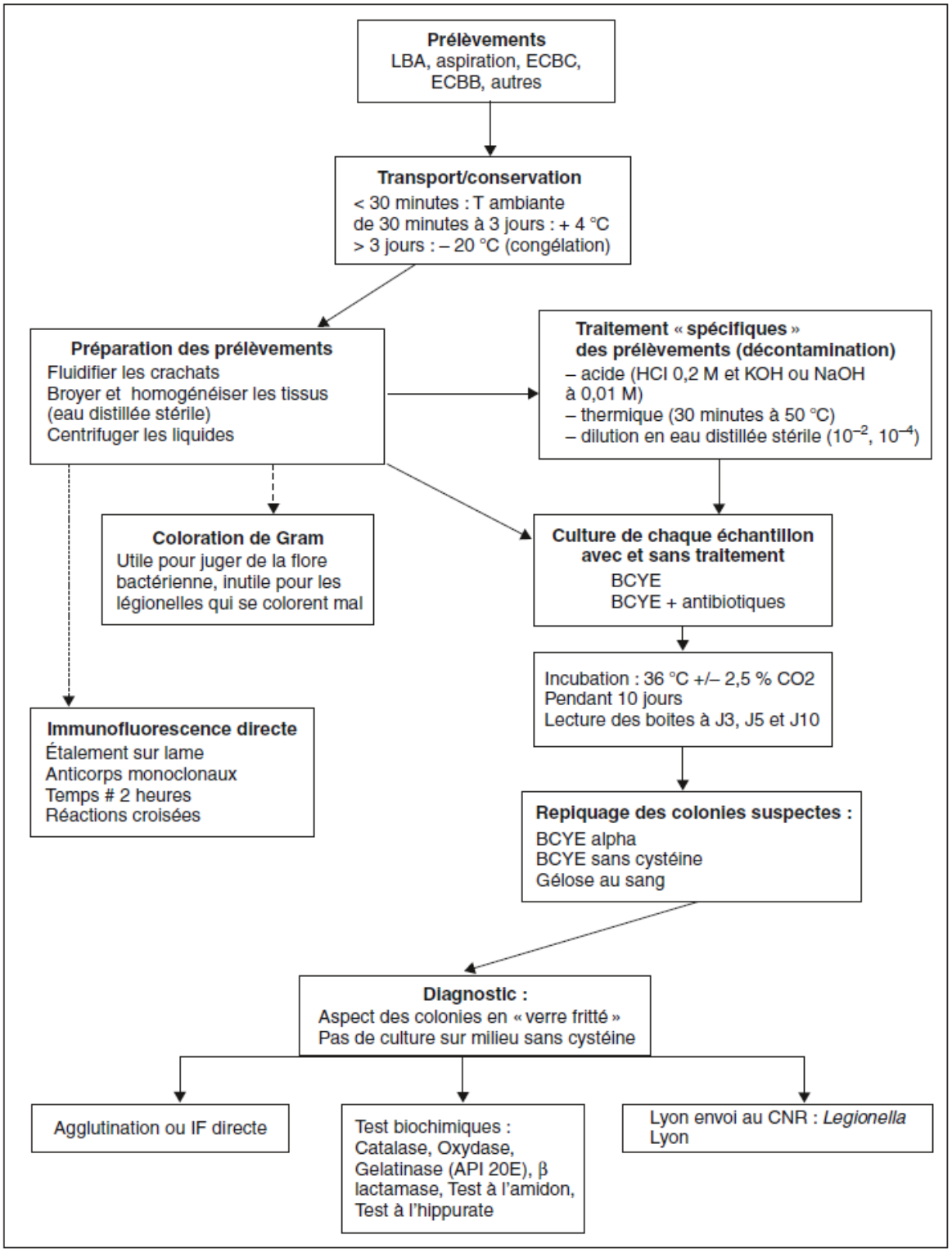


Figure 23: Schéma récapitulatif du diagnostic par culture (Denis, Bidet, and Bingen 2011).

VI.b. 6. Méthodes moléculaires

Des techniques de PCR et de PCR en temps réel ont été appliquées avec succès à divers prélèvements respiratoires ou de l'environnement avec des sensibilités supérieures à la culture.

Les techniques de biologie moléculaire comme l'amplification aléatoire de l'ADN (*random amplified polymorphic DNA [* RAPD]) ou des techniques de séquençage nucléotidique (gène *mip*) se développent très rapidement et sont des méthodes d'identification et de comparaison de souches performantes. Elles pourraient dans l'avenir remplacer les techniques actuelles.

Les méthodes moléculaires permettent des recherches qualitatives et quantitatives des légionelles donnant une réponse beaucoup plus rapide que les cultures.

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. “DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ’ UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE.” : 1–37.

Bébéar, C, and C M Bébéar. “C. Bébéar, C.M. Bébéar.”

Bingen, E. “Analyse Bactériologique Des Selles.”

Colobert, L. 1967. “La Biologie Moléculaire.” *La Presse medicale* 75(31): 1623–24.

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. “Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ’ Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents.” *Techniques*.

Denis, F, P Bidet, and E Bingen. 2011. “Bacilles à Gram Négatif Aérobies et Aéro-Anaérobies.” *Bactériologie Médicale*: 331–427.

Fièvre, La et al. 2007. “Marion DEBIN.” *Année*: 2007–3.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. “Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire.” *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Garnier, F., M.-C. Ploy, and F. Denis. 2011. “Cocci à Gram Négatif.” *Bactériologie Médicale*: 321–30.

Gram, Bacilles. 2011. “Bacilles à Gram Positif (à l’exception Des Anaérobies).” *Bactériologie Médicale*: 443–74.

Leishmanioses, L E S. 2012. “Pour l ’ Obtention Du Doctorat En Pharmacie.” *These*.

Lucas, F et al. 1991. “Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ’ Action To Cite This Version :”

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. “Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes.” *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen. 2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Martin, C., and F. Denis. 2011. “Mycobactéries.” *Bactériologie Médicale* 3: 507–35.

Ploy, M.-C., and F. Denis. 2011. “Orientation Générale.” *Bactériologie Médicale*: 283–85.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE module : Microbiologie médicale

La tuberculose : Mycobacterium tuberculosis complex

Généralité

Les mycobactéries sont des micro-organismes responsables de maladies chez l'homme et chez les animaux. En bactériologie, on distingue classiquement les mycobactéries tuberculeuses responsables de la tuberculose des mycobactéries non tuberculeuses, agents de mycobactérioses survenant le plus souvent sur des terrains fragilisés (sujets mucoviscidosiques) ou immunodéprimés (sujets greffés, sida). Le diagnostic de tuberculose ou de mycobactériose est un diagnostic clinique, radiologique et bactériologique. La distinction entre ces deux entités ne peut être réalisée qu'au laboratoire.

Le genre *Mycobacterium* est le seul genre de la famille des *Mycobacteriaceae* dans l'ordre des actinomycétales Les mycobactéries se présentent comme des bacilles aérobies ou microaérophiles, immobiles, non ramifiés et non sporulés présentant une propriété tinctoriale essentielle : l'acido-alcoolo-résistance (BAAR) due à la richesse en lipides de leur paroi. Les contraintes techniques d'études des mycobactéries dues à une croissance lente, une structure pariétale complexe ont longtemps retardé l'acquisition des connaissances concernant le genre *Mycobacterium* par rapport à d'autres genres d'intérêt médical. Dans les années 1990, le développement de méthodes de culture rapide en milieu liquide ont permis une diminution des délais d'obtention des souches et des antibiogrammes. Au même moment, l'avènement des techniques de biologie moléculaire d'amplification génique et le séquençage automatisé ont permis de connaître la séquence complète du génome de *M. leprae* , de *M. tuberculosis* H37Rv puis de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* . Les techniques bactériologiques mises en oeuvre pour l'étude des mycobactéries sont spécifiques, ce qui oblige chaque laboratoire ayant un secteur de mycobactériologie à s'équiper (hottes aspirantes de type PSM1, étuves pour conservation longue, milieux spécifiques) et à adopter une organisation particulière dictée par les impératifs techniques (ensemencements, lectures, délais longs).

Habitat et pouvoir pathogène

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en trois grandes entités : la lèpre (*M. leprae*), la tuberculose dont les agents étiologiques sont les bacilles tuberculeux

■ ***M. tuberculosis*** (bacille de Koch, BK) : Réservoir principal : homme. Contamination pulmonaire interhumaine (contamination animale possible)

■ ***M. africanum*** : Réservoir principal : homme. Majoritairement en Afrique Noire, rares cas européens

■ ***M. canettii*** : Corne de l'Afrique

■ ***M. bovis*** : Réservoir : bovins, animaux domestiques ou sauvages. Contamination digestive (lait cru infecté) : rare dans les pays « riches »

■ ***M. caprae*** : Réservoir principal : chèvres. Transmission possible à l'homme

■ ***M. pinnipedii*** : Réservoir : pinnipèdes (mammifères marins). Cas d'infection décrits chez un homme, un tapir et un bovin néo-zélandais

■ ***M. microti*** : Réservoir : rongeurs (campagnols, lapins, cobayes…), voire bovins. Non pathogène pour l'homme.

Et les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » (*M. avium, M. abscessus, M. chelonae, M. intracellulare, M. kansasii, M. marinum, M. szulgai, M. ulcerans, M. xenopi*, etc.).

Actuellement, plus de 140 espèces de mycobactéries ont été décrites. En fonction de leur vitesse de croissance, les mycobactéries sont séparées en deux groupes (mycobactéries à croissance lente et mycobactéries à croissance rapide). La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomique 16S (croissance lente) ou de deux copies (croissance rapide) est corrélée à la vitesse de croissance.

Tableau 4: Supports fondamentaux des particularités du diagnostic au laboratoire des infections à mycobactéries.

Données fondamentales	***Propriétés***	***Étapes concernées***
Nombre de copies ADNr 16S		
1 seule copie	Croissance lente	Culture sur milieux riches (Löwenstein- Jensen) et durée d'incubation longue
2 copies	Croissance rapide	Culture sur milieux ordinaires et durée d'incubation courte
Séquences d'insertion répétées	Différenciation *intraspecies*	Épidémiologie moléculaire
Métabolisme lipidique (données génétiques et chromatographiques)	Affinité tinctoriale Hydrophobicité – Résistance aux agents chimiques – Résistance aux antibiotiques hydrophiles	Examen direct (Auramine, Ziehl-Neelsen) Décontamination (soude) Familles d'antibiotiques actives (isoniazide, rifampicine, éthambutol, pyrazinamide)
Gènes du métabolisme aérobie et anaérobie	Adaptation à la tension en oxygène	Incubation en aérobiose
Antigènes polysaccharidiques, protéiques et glycolipidiques	Antigénicité	Possibilité de sérologie mais nombreuses réactions croisées

II.1. Physiopathologie

- Pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* Complex
- Multiplication lente → Infection chronique
- Multiplication en milieu bien oxygéné → Poumon +++
- Réponse de l'hôte → **Hypersensibilité retardée**
- Immunité cellulaire +++ (macrophages, LT4, LT8)

- Destruction des tissus infectés
- Inflammation chronique

Tuberculose = infection nécrosante d'aspect chronique

II.2. Stades de la maladie

- « Tuberculose infection » (ancienne primo-infection)
- Réaction de l'organisme au 1er contact avec le BK
- Le plus souvent asymptomatique (ou syndrome pseudo-grippal)
- Voie pulmonaire +++
- Virage tuberculinique, recherche de BK négative
- Absence de risque contagieux
- « Tuberculose maladie »
- Manifestation secondaire du BK
- Signes cliniques +++
- Localisation surtout pulmonaire + atteinte ganglionnaire
- Recherche BK positive, signes radiologiques
- Risque contagieux +++
- « Tuberculose latente »
- Période entre tuberculose infection et tuberculose maladie
- Durée +/- longue (inexistante ou plusieurs années)
- Asymptomatique
- Physiopathologie
- Inhalation et passage dans les alvéoles pulmonaires (≤ 1 µm)
- Phagocytose et multiplication dans les macrophages
- Formation d'un granulome (ou tubercule) pulmonaire

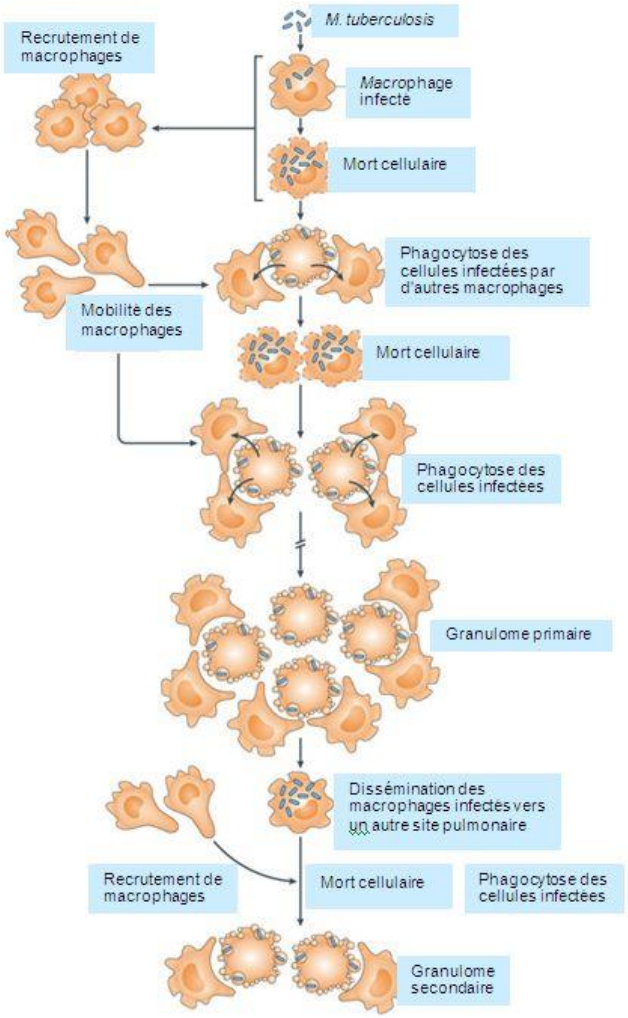


Figure 24: Formation de la lésion initiale primaire. La multiplication du bacille au sein des cellules phagocytaires aboutit à la mort de ces cellules qui sont phagocytées par de nouveaux macrophages qui ont été recrutés au site de l'infection

.

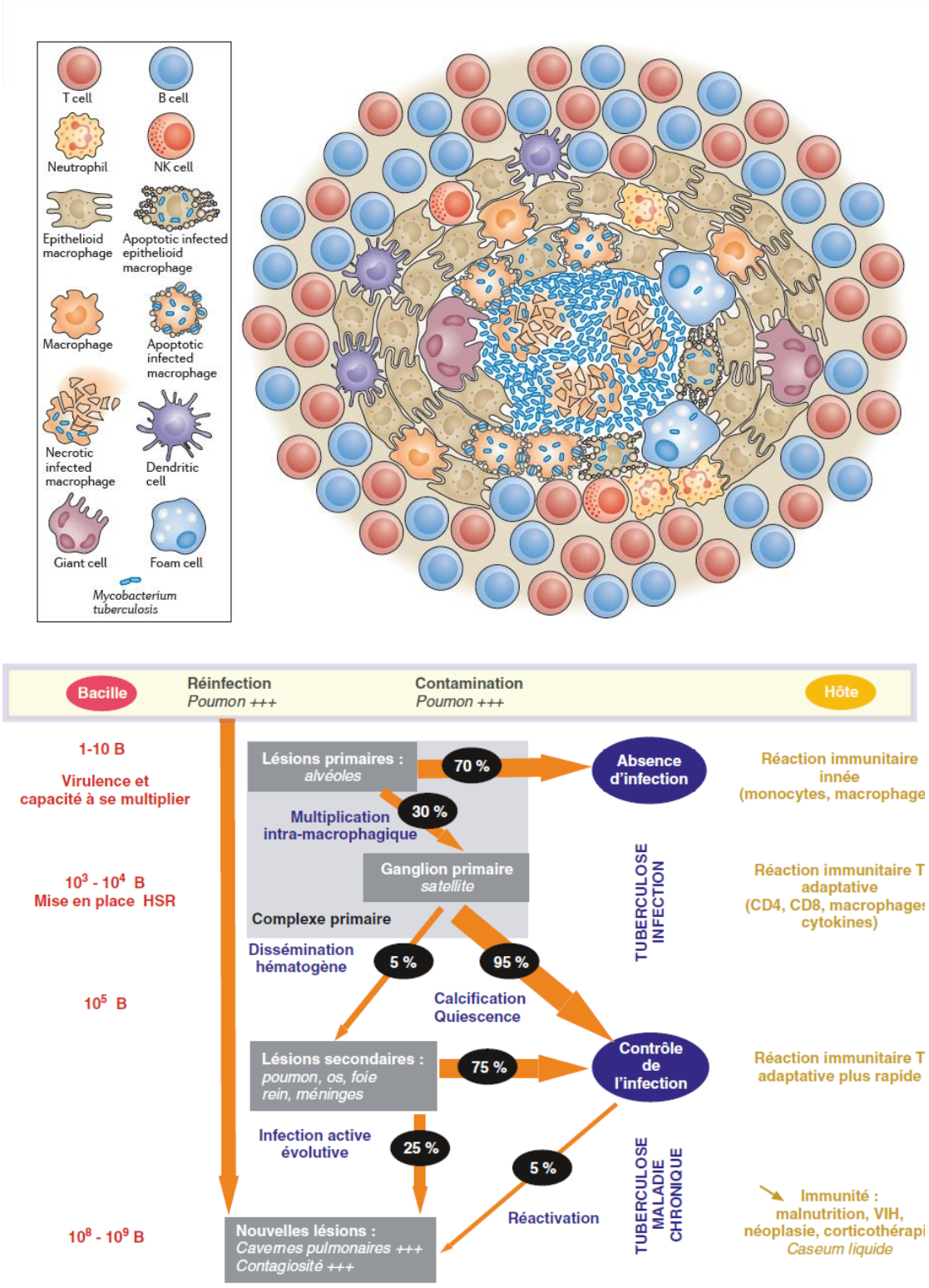


Figure 25: Équilibre physiopathologique lors de la tuberculose (Martin and Denis 2011).

Tuberculose maladie

- 5 à 10 % des cas : réactivation bacillaire et extension des lésions
- Localisation pulmonaire la plus fréquente (3/4 cas) :

■ Fièvre prolongée assez discrète (38°C) avec sudations profuses nocturnes, perte de poids, asthénie

■ Toux précoce, constante, productive, avec des quintes : expectorations blanchâtres et muqueuses

■ Contagiosité +++

■ Autres localisations :

■ rénale, urogénitale, ostéo-articulaire, ganglionnaire, péricardique…

■ Tuberculose généralisée (ID)

■ Méningite tuberculeuse (enfants, vieillards)

■ Facteurs aggravants : âges extrêmes, malnutrition, alcoolisme, diabète, Immunodépression ++

Démarche diagnostique

La confirmation bactériologique du diagnostic de la tuberculose ou de mycobactériose doit, dans tous les cas, être recherchée. Le diagnostic bactériologique comprend obligatoirement un examen direct et une culture. L'isolement de la souche donnera lieu à une identification et systématiquement à une étude de la sensibilité aux antituberculeux majeurs pour les mycobactéries de la tuberculose. Parmi les techniques de détection (amplification génomique) et de diagnostic rapide (antigènes solubles urinaires, anticorps) récemment développées,

III.1. Éléments évocateurs

A. Contexte épidémiologique

■ Notion de **contage**

■ Infection VIH

■ Contexte d'ID (corticoïdes, immunosuppresseur, anti-TNF)

■ Provenance d'un **pays endémique**

B. Signes cliniques

■ Signes respiratoires : **toux**, hémoptysies, dyspnée

■ Signes généraux : **amaigrissement**, asthénie, fièvre, **sueurs nocturnes**

C. Diagnostic biologique de la tuberculose maladie

1- Prélèvements

2- Fluidification/Décontamination des prélèvements

3- Examen direct (+/- PCR)

4- Culture

5- Identification :

- Tests immuno-chromatographiques
- Tests génomiques : PCR/sondes

6- Antibiogramme

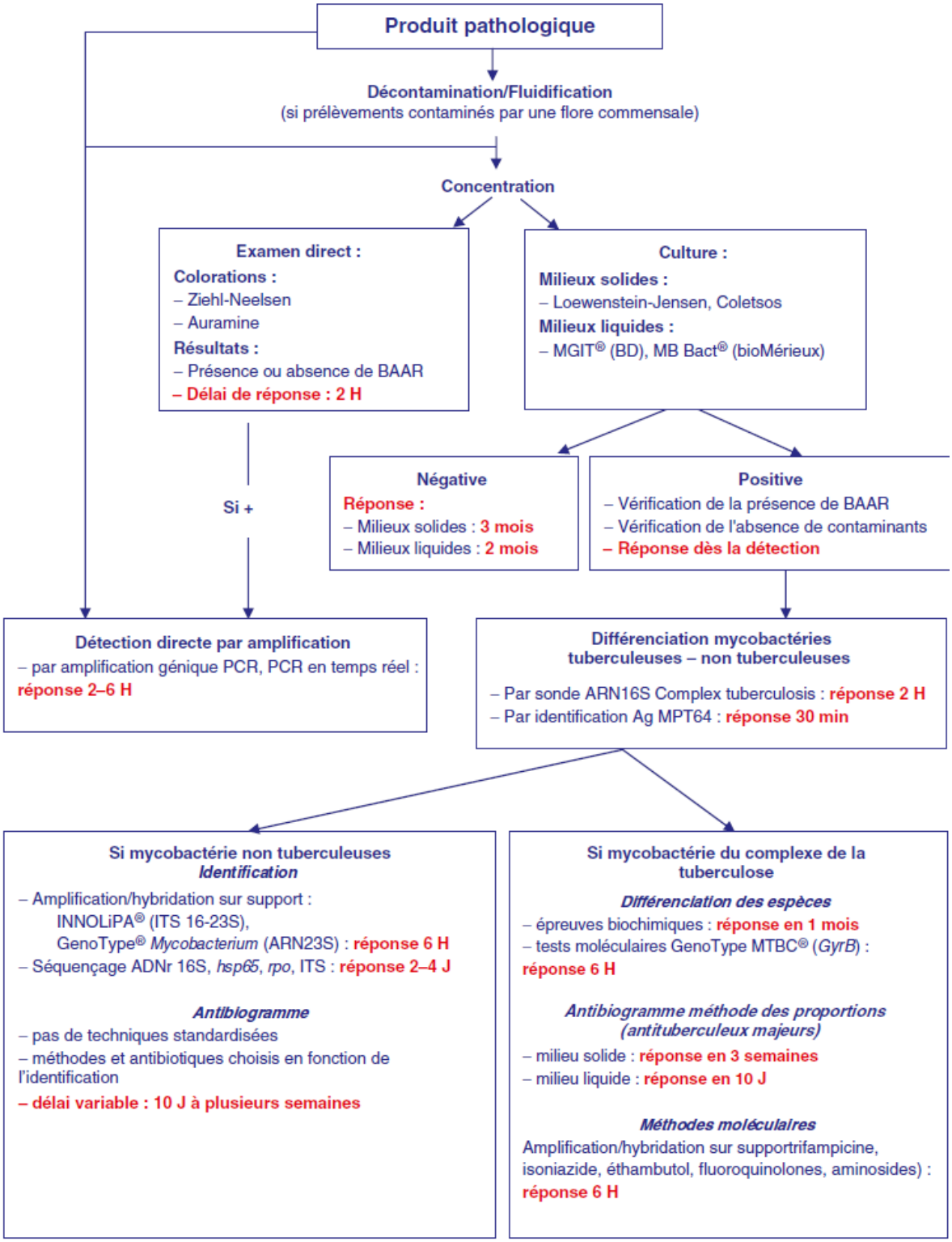


Figure 26: Principales étapes du diagnostic bactériologique des infections à mycobactéries (Martin and Denis 2011).

III.C.1. Prélèvements

Tous les organes peuvent être le siège d'une infection à mycobactéries. Pour la majorité des prélèvements destinés à la recherche de mycobactéries, les techniques de prélèvement ne sont pas différentes des autres recherches.

- Excrétion des BK intermittente → répétition des prélèvements 3 jours de suite +++

Prélèvements plurimicrobiens

- **Respiratoires** : le matin, au réveil, à jeun
- Crachats / expectorations éviter les prélèvements salivaires.
- Tubage gastrique le recueil des sécrétions bronchiques dégluties
- Prélèvement sous fibroscopie (aspiration, brossage, LBA)
- **Urinaires** : sur la totalité des urines du matin en l'absence de fortes présomptions de tuberculose rénale, seules les urines présentant une pyurie aseptique (leucocyturie supérieure à 10 000/ml) seront ensemencées.

Prélèvements monomicrobiens

- Liquide pleural
- LCR et liquides d'épanchements (ascites, pleuraux, articulaires) Un volume de 3 ml est nécessaire à l'étude cytobactériologiquede ces prélèvements
- Pus de collection interne
- Biopsies (ganglionnaire, pulmonaire ou autre)
- Hémocultures / Myélocultures (infections disséminées)

Décontamination, fluidification, concentration But :

- éliminer bactéries contaminantes
- favoriser développement mycobactéries
- Sélection des mycobactéries par leur résistance aux agents chimiques agressifs
- Fluidification/Décontamination : soude + N-acétyl-cystéine pendant 20-30 min
- Neutralisation

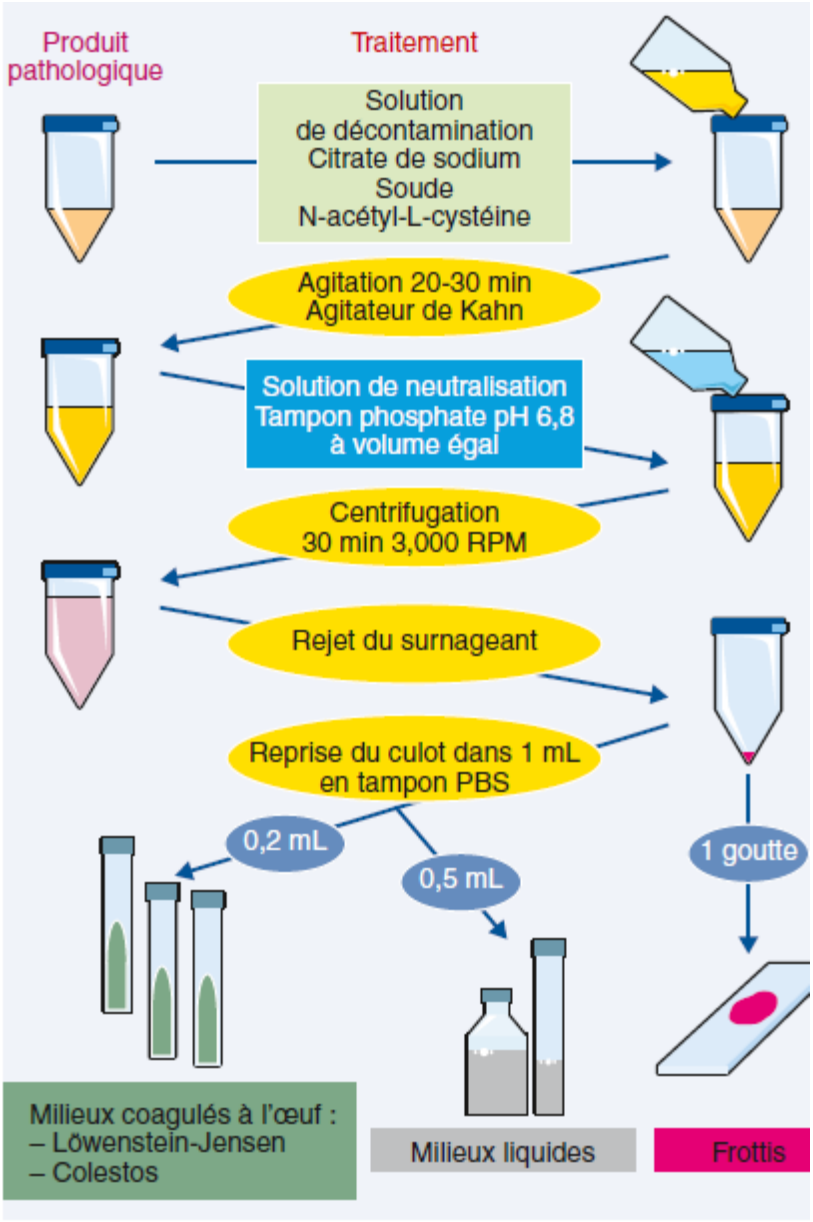


Figure 27: Étapes de la décontamination d'un produit pathologique. Exemple de la méthode de Kubica (Martin and Denis 2011).

Tableau 5 : Caractéristiques des différentes méthodes de décontamination des échantillons en vue de la recherche de mycobactéries

Méthode	***Agent décontaminant***	***Agent fluidifiant***	***Neutralisation***	***Cultures milieux liquides***	***Amplification***	***Remarques***
Tacquet-Tison	Soude 1 % Soude 2 %	Lauryl sulfate	Acide sulfurique	–	–	Activité bactériostatique de l'agent fluidifiant, biologie moléculaire non réalisable
Kubica	Soude 1 %	N-acétyl-cystéine 0,5 % Citrate de sodium	Tampon phosphate	+	+	Recommandée si milieux liquides
Petroff	Acide oxalique	Soude 2 % 0	Acide chlorhydrique Tampon phosphate	+ +	+ +	Moindre sensibilité Peut être associée à la méthode de Kubica

III.C .2. Examen direct

Les espèces du genre *Mycobacterium* sont difficilement colorées par la coloration de Gram. Le principe des colorations (Ziehl-Neelsen, auramine) des mycobactéries Les frottis sont effectués soit après centrifugation (30 minutes de centrifugation à 3000 rpm) pour les prélèvements non contaminés, soit à partir du culot de décontamination pour les autres prélèvements.

III.C .2. a. Coloration de Ziehl-Neelsen

Le frottis est coloré par une solution alcoolique saturée de fuchsine basique phéniquée pendant 10 minutes. Après décoloration (3 minutes) avec un mélange acide–alcool (acide sulfurique à 25 % dans l'alcool à 90°), la lame est rincée à l'eau distillée stérile puis contre-colorée 3 minutes par une solution aqueuse de bleu de méthylène à 3 %. Les frottis sont ensuite

rincés à l'eau distillée puis séchés à l'étuve. L'observation est effectuée à l'objectif ´ 100 à l'immersion avec de l'huile minérale.

Les mycobactéries colorées par la fuchsine phéniquée apparaissent en rouge vif sur le fond bleu de la préparation (débris cellulaires, mucus, bactéries commensales)

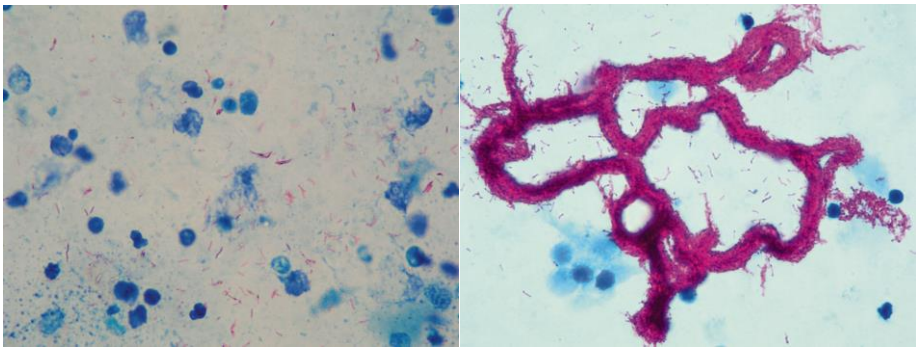


Figure 28 : Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration de Ziehl-Neelsen (grossisse ment ´ 1000). Présence de bacilles colorés en rose (BAAR). A droite regroupement en « cordes » (Martin and Denis 2011).

III.C .2.b. Coloration à l'auramine

Le principe de la coloration est le même que pour la coloration de Ziehl-Neelsen : coloration des bacilles par une solution d'auramine O phéniquée à froid pendant 15 minutes. Après rinçage avec de l'eau distillée, une décoloration pendant 5 minutes par le mélange acide–alcool (acide chlorhydique–éthanol) est réalisée. Une contre-coloration avec une solution de rouge de thiazine (1 minute) est effectuée après un nouveau rinçage à l'eau distillée. Les lames séchées recouvertes d'une lamelle en verre sont observées à l'aide d'un microscope muni d'un dispositif à fluorescence à l'objectif ´ 25.Les mycobactéries apparaissent comme des bacilles fluorescents jaune-vert sur fond rouge

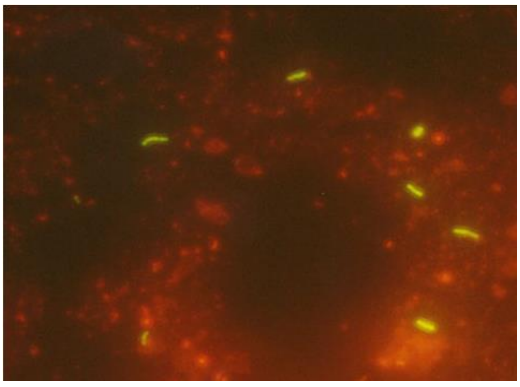


Figure 29 Examen direct d'un frottis réalisé à partir d'une expectoration après coloration à l'auramine (grossissement ´ 400). Présence de bacilles colorés en jaune fluorescent (BAAR) (Martin and Denis 2011).

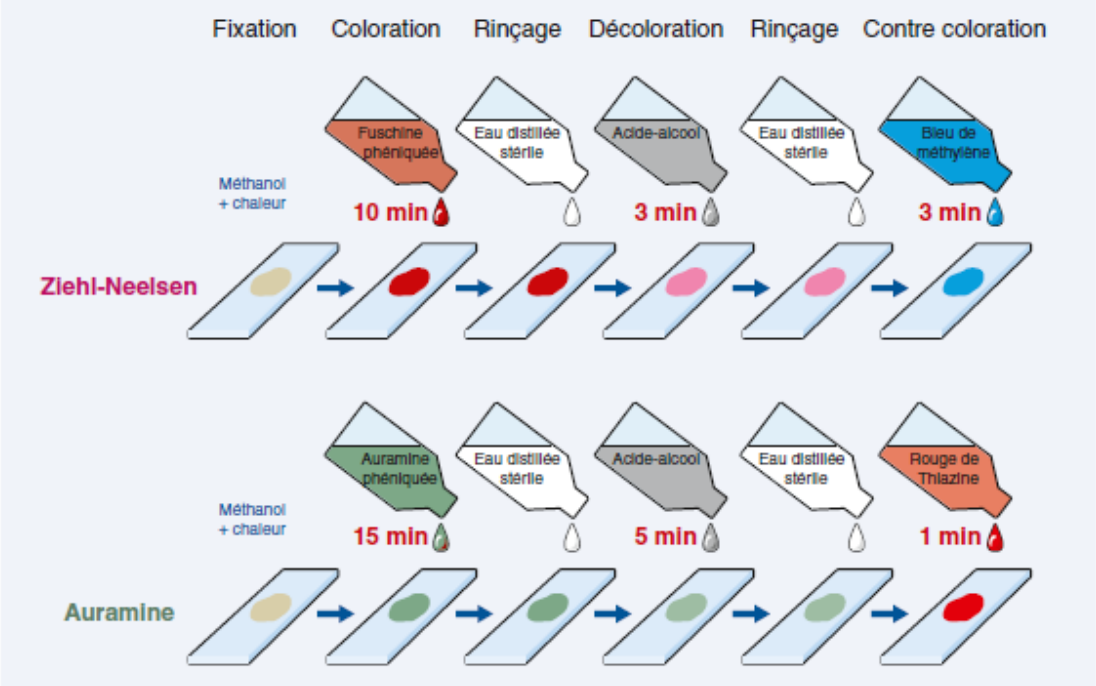


Figure 30: Étapes de la coloration de Ziehl-Neelsen et de la coloration à l'auramine (Martin and Denis 2011).

III.C .3. Méthodes de culture

La culture des mycobactéries nécessite le recours à des milieux spécifiques et complexes en raison d'une croissance lente (quelques jours à plusieurs semaines)

III.C .3.a. Milieux solides

Le milieu le plus utilisé pour l'ensemencement des produits pathologiques est le milieu de Löwenstein-Jensen à base de sels minéraux, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vert malachite (antiseptique) et d'œuf (albumine). L'adjonction de certains composés comme le pyruvate de sodium dans le milieu de Coletsos ou le citrate de fer favorise la croissance respectivement de *M. bovis* , *M. africanum* et de *M. haemophilum* . Les milieux sont présentés sous forme de tubes fermés à vis ou par du coton et obturés par une capsule en plastique. Trois gouttes du culot de centrifugation sont déposées au sommet de la pente gélosée. Deux (si couplés à des milieux liquides) à six tubes sont ensemencés et incubés à 37 °C exceptés pour les prélèvements d'origine cutanée et ostéoarticulaire, incubés à 30, 37 et 42 °C. Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48 heures). Les milieux sont observés une fois par semaine pendant au moins 8 semaines. L'observation des cultures durant la première semaine permettra de mettre en évidence une contamination par des bactéries commensales ou la présence d'une mycobactérie à croissance rapide. Dès l'apparition de colonies, un frottis coloré par la méthode de Ziehl-

Neelsen sera effectué pour vérifier la présence de BAAR avant de déclarer la culture positive. Le nombre de colonies est rapporté ainsi que le délai d'apparition de la culture. Sur milieu de Löwenstein-Jensen, les colonies de *M. tuberculosis* apparaissent après 2 à 3 semaines d'incubation en fonction de la densité microbienne de l'échantillon. Les colonies sont lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur dites « eugoniques ». Les colonies de *M. bovis* et *M. africanum* ont une croissance plus lente : 3 à 6 semaines sur milieu Löwenstein. Les colonies de *M. bovis* apparaissent plates, petites (1 à 2 mm), lisses « dysgoniques », blanchâtres, brillantes, tandis que les colonies de *M. africanum* se présentent avec les caractéristiques suivantes : petites colonies rondes, mates, crèmes et granuleuses.

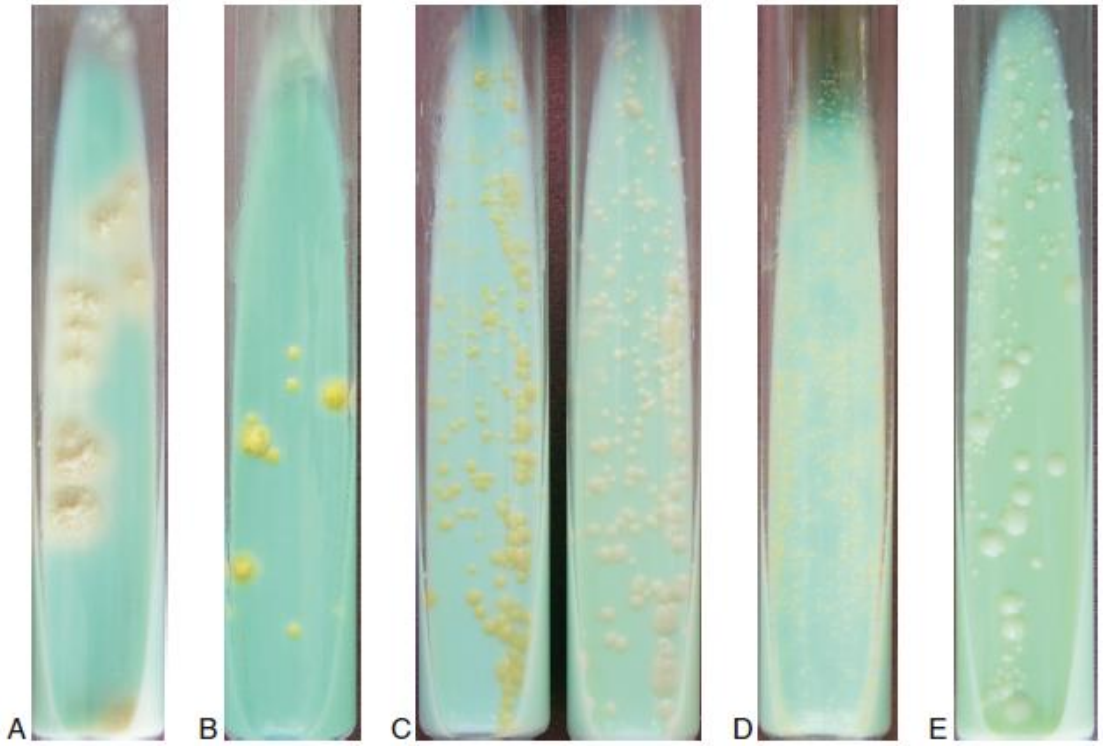


Figure 31: Cultures sur milieu de Löwenstein-Jensen (Martin and Denis 2011).

A) – Colonies de *Mycobacterium tuberculosis*.

B) – Colonies de *Mycobacterium szulgai* (espèce scotochromogène).

C) – Colonies de *Mycobacterium marinum* (espèce photochromogène).

D) – Colonies de *Mycobacterium xenopi* (espèce non pigmentée à croissance lente).

E) – Colonies de *Mycobacterium chelonae* (espèce à croissance rapide).

III.C .3.b. Milieux liquides

- **Middle-Brooke** (7H9, 7H12)
- Milieu semi-synthétique et transparent

■ Pas d'œuf (utilisation limitée pour certains décontaminants)

III.D. Identification

Les techniques de biologie moléculaire d'identification ont supplanté les méthodes biochimiques.

III.D.1. Stade initial : différenciation entre mycobactéries du complexe de la tuberculose et mycobactéries non tuberculeuses

Le premier stade de l'identification a pour but de différencier les mycobactéries de la tuberculose des autres mycobactéries. Cette étape n'est réalisée qu'après contrôle microscopique de la présence de BAAR sur les milieux de culture. Deux techniques (hybridation en milieu liquide et immunochromatographie) sont actuellement disponibles. Une sonde monospécifique (*Mycobacterium tuberculosis* Complex, Accuprobe®) d'ADN complémentaire d'ARNr 16S marquée par un ester d'acridinium est mise en présence d'un lysat de culture préparé à partir de milieux solides ou liquides.

Après hybridation avec l'ARN ribosomique et élimination des fragments de sonde non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente de très bonnes sensibilité (100 %) et spécificité (proche de 100 %).

Plus récemment, une technique immunochromatographique, reposant sur la mise en évidence de l'antigène MPT64, permet une identification des isolats du complexe *tuberculosis* en 15 minutes. Des résultats faussement négatifs avec des isolats de *M. bovis* BCG ont été rapportés avec cette technique.

III.D.2. Différenciation des espèces du complexe de la tuberculose

La détermination des espèces à l'intérieur de ce complexe fait appel à des épreuves phénotypiques en première intention. Les souches à phénotype indéterminé nécessiteront alors l'utilisation de méthodes moléculaires (par détection du polymorphisme du gène *gyrB* , GenoType® MTBC, Hain Diagnostika).

III.D.2.a. Réactions phénotypiques

Le délai d'obtention des cultures et la morphologie des colonies associées à l'étude de quelques caractères biochimiques permettent de porter un diagnostic des mycobactéries tuberculeuses. Le diagnostic d'espèces précis des mycobactéries du complexe de la tuberculose est effectué en réalisant les épreuves suivantes :

• à partir d'une culture abondante sur milieu solide âgée de 4 semaines, recherche de la production de niacine (acide nicotinique) à l'aide de bandelette réactive (TB Niacin test strip®, recherche de la nitrate réductase.

• croissance sur milieu Löwenstein-Jensen contenant du TCH (acide 2-thiophène carboxylique) (Biorad) à 2 mg/l ;

• croissance sur milieu Löwenstein-Jensen contenant30 mg/ml de D-cyclosérine (bioMérieux).

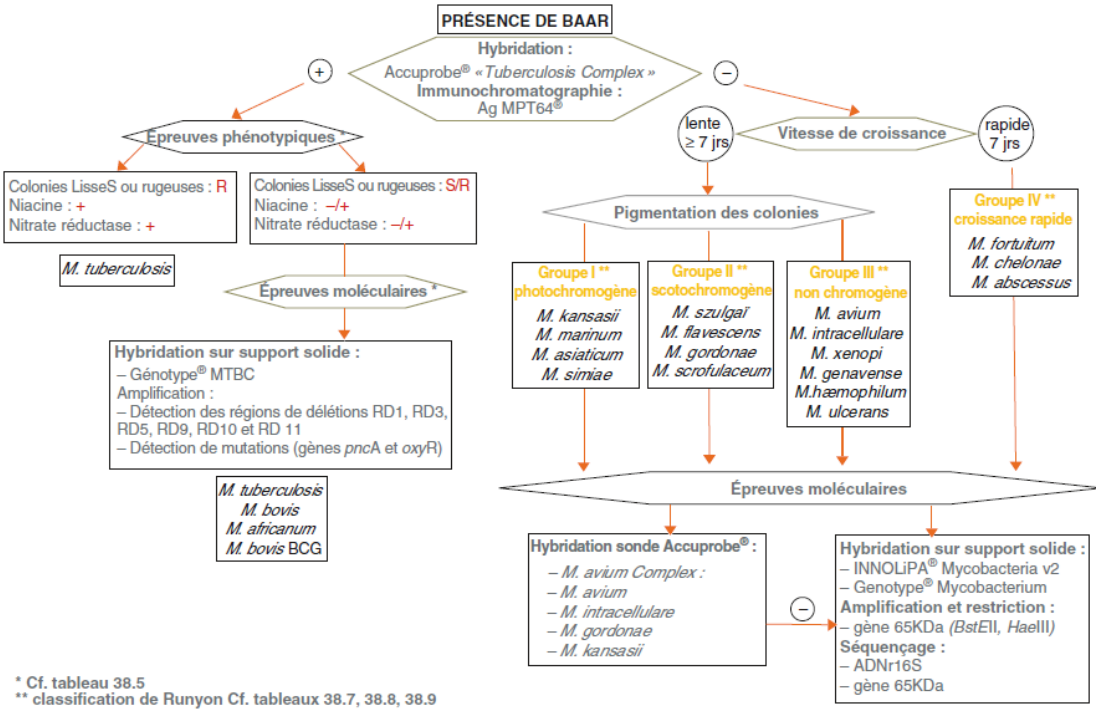
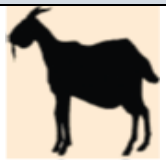
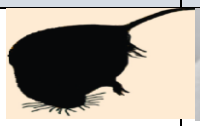
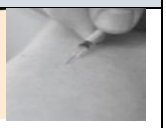


Figure 32: Arbre décisionnel pour l'identification des mycobactéries au laboratoire (Martin and Denis 2011).

Tableau 6**:** Caractéristiques phénotypiques et génotypiques des mycobactéries du complexe de la tuberculose

Caractères / Espèces	*M. tuberculosis*	*M. africanum*	*M. bovis*	*M. caprae*	*M. pinnipedii*	*M. microtii*	*BCG*
							
Fréquence d'isolement	++++++	++	++	+	+	+	++
Phénotypiques							
Morphologie des colonies	Rugueuse	Eugonique	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Rugueuse
Niacine	+	+/-	–	–	–	– –	–
TCH	R	R/S	S	S	R/S	S	S
Pyrazinamide	S	S	R	S	S	S	R
Tbl	S	S/R	S	S	S	S	R
D-cyclosérine	S	S	S	S	S	S	R
Génotypiques							
mpt40	+	+	-	-	+	-	-
pnc A (nucléotide 169)	C	C	G	C	C	C	G
oxy R (nucléeotide 285)	G	G	A	A	C	C	A
Spoligotype : spacers 39–43	Présence (1 à 5)	Variable	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence
RD1	+	+	+	+	+	+	-
RD4	+	+	-	+	+	+	-
RD9	+	-	-	-	-	-	-
RD12	+	+	+	-	+	+	-

III.D. 2.b. Détection génomique

Les techniques de détection génomique après amplification sont réalisées sur des produits pathologiques décontaminés

Traitement

- Toujours association de molécules.
- Avec un traitement adapté et correctement suivi, la TB devrait guérir dans presque tous les cas.
- Schéma thérapeutique classique (TB pulm et extra-pulm)
- 2 mois avec Isoniazide + Rifampicine + Ethambutol + Pyrazinamide
- 4 mois avec Isoniazide + Rifampicine

Antibiogramme

- Émergence de souches **multirésistantes** voire **ultrarésistantes** = nécessité de l'ATBgramme

V.1. Méthode des proportions :

Recherche des mutants résistants

- Inoculum en présence d'ATB vs Inoculum en absence d'ATB
- Comparaison nbe bactéries avec ATB / nbe bactéries sans ATB
- Techniques +/- longues :
- Méthode des proportions en milieu solide : plusieurs semaines
- Etude de la proportion de mutants R en milieu liquide = antibiogramme en milieu liquide : plusieurs jours (positif si > 1% de mutants R)

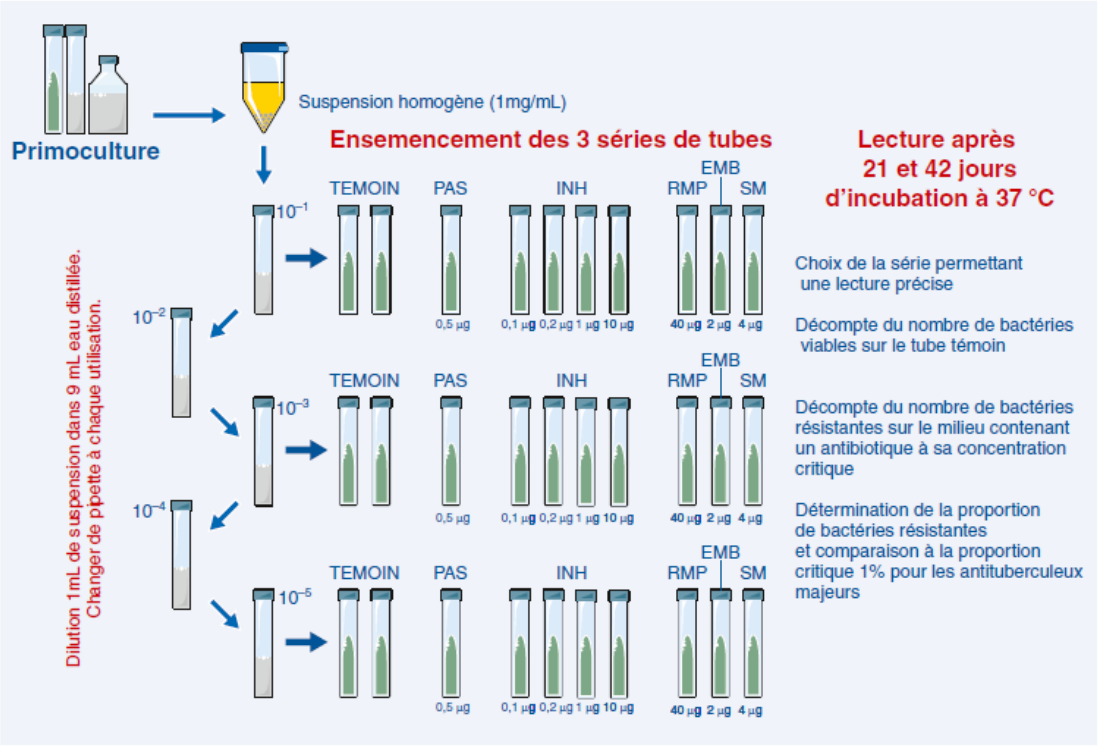


Figure 33: Étude de la sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries de la tuberculose sur milieux solides (Löwenstein-Jensen) par la méthode des proportions (Canetti, Rist, Grosset).

V.2. Méthode des proportions en milieu liquide

La méthode des proportions en milieu liquide est analogue à celle réalisée en milieu solide, mais permet de raccourcir le délai de réponse. La mesure automatisée de la croissance se fait par fluorescence (MGIT 960®).

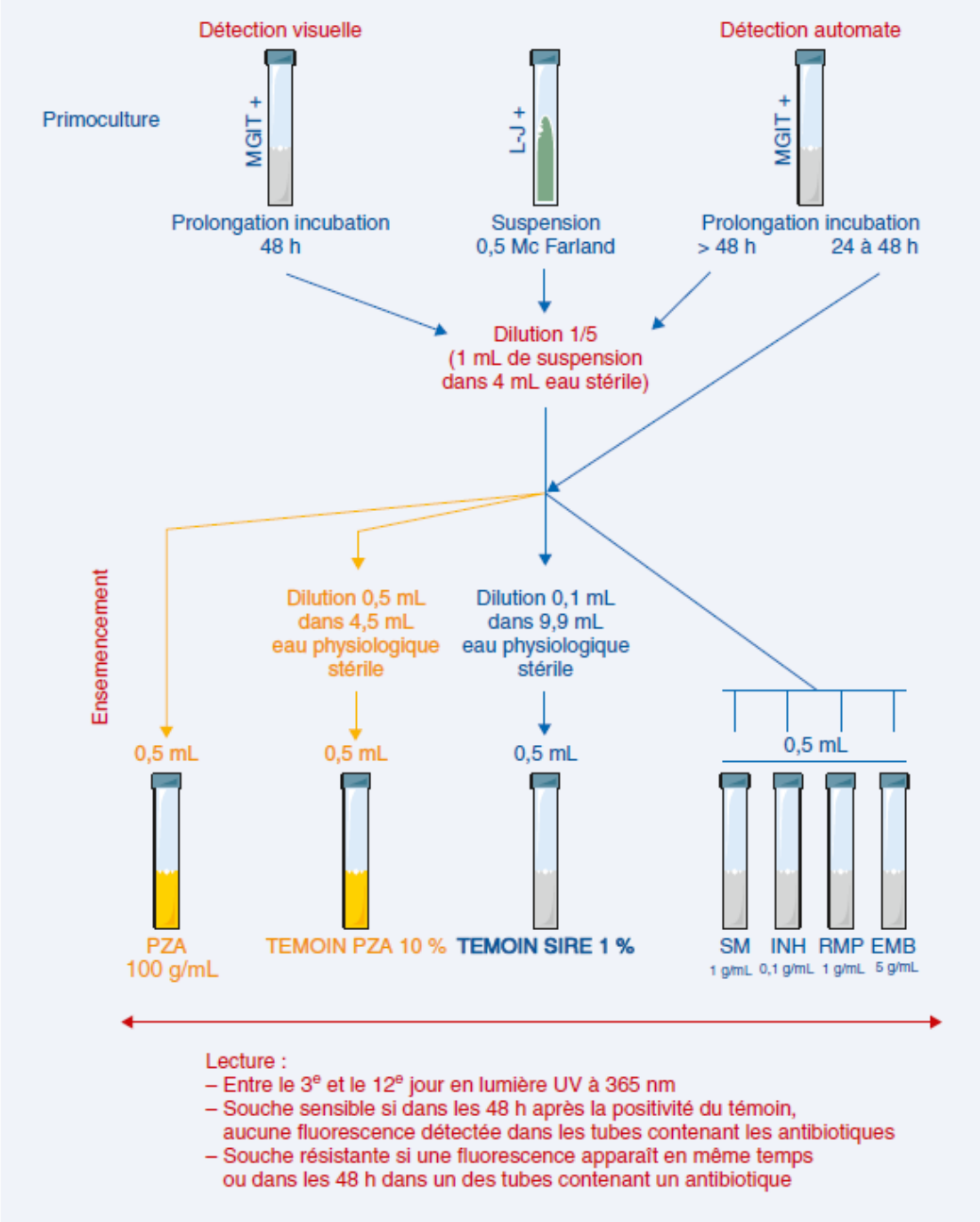


Figure 34: Étude de la sensibilité aux antituberculeux en milieux liquides par la méthode MGIT® (Bactec) (Martin and Denis 2011).

V.3. Méthodes moléculaires

La résistance acquise aux antibiotiques chez *M. tuberculosis* est toujours liée à des mutations des gènes chromosomiques et n'est pas transférable d'une souche à l'autre.

Il n'a pas été décrit de plasmides ou de transposons de résistance. Les mutations responsables de la résistance aux antibiotiques peuvent être identifiées après amplification des gènes (ou fragments de gènes) sur lesquels elles sont localisées. Les mutations peuvent aussi

être identifiées par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques comme dans la technique LiPA ou *line probe assay* . Cette méthode consiste à hybrider les fragments amplifiés avec des sondes préfixées sur une bandelette

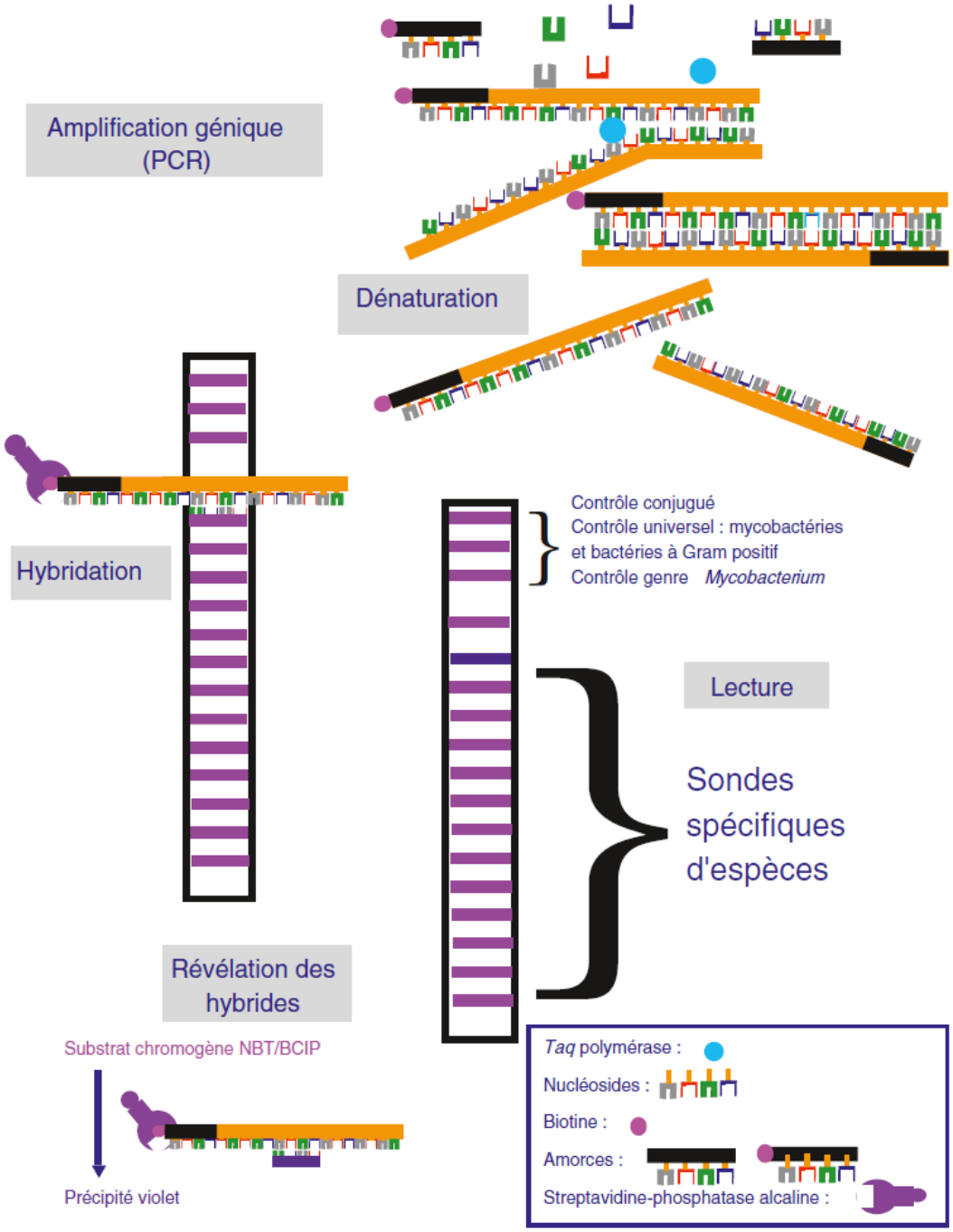


Figure 35: Principe des méthodes d'identification et de détection de la résistance aux anti-tuberculeux par PCR et hybridation sur support solide (Martin and Denis 2011).

Références

Archambaud, M, and D Clave. 2008. “DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ’ UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE.” : 1–37.

Bébéar, C, and C M Bébéar. “C. Bébéar, C.M. Bébéar.”

Bingen, E. “Analyse Bactériologique Des Selles.”

Colobert, L. 1967. “La Biologie Moléculaire.” *La Presse medicale* 75(31): 1623–24.

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. “Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ’ Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents.” *Techniques*.

Denis, F, P Bidet, and E Bingen. 2011. “Bacilles à Gram Négatif Aérobies et Aéro-Anaérobies.” *Bactériologie Médicale*: 331–427.

Fièvre, La et al. 2007. “Marion DEBIN.” *Année*: 2007–3.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. “Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire.” *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Garnier, F., M.-C. Ploy, and F. Denis. 2011. “Cocci à Gram Négatif.” *Bactériologie Médicale*: 321–30.

Gram, Bacilles. 2011. “Bacilles à Gram Positif (à l’exception Des Anaérobies).” *Bactériologie Médicale*: 443–74.

Leishmanioses, L E S. 2012. “Pour l ’ Obtention Du Doctorat En Pharmacie.” *These*.

Lucas, F et al. 1991. “Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ’ Action To Cite This Version :”

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. “Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes.” *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen. 2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Martin, C., and F. Denis. 2011. “Mycobactéries.” *Bactériologie Médicale* 3: 507–35.

Ploy, M.-C., and F. Denis. 2011. “Orientation Générale.” *Bactériologie Médicale*: 283–85.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”

MICROBIOLOGIE APPLIQUEE **module : Microbiologie médicale**

Corynebacterium diphtheriae

Introduction

Définition morphologique : le terme « coryne » se réfère à la forme renflée d'une ou des deux extrémités de ces bacilles

Morphologie typique du genre *Corynebacterium* mais également observée pour de nombreux autres genres.

En pratique, on peut réunir sous le terme corynébactéries tous les bacilles à Gram positif de formes irrégulières, non sporulés, non filamenteux et de type respiratoire aérobie ou anaérobie facultatif.

Synonymes : corynébactéries, corynéformes, diphtéroides

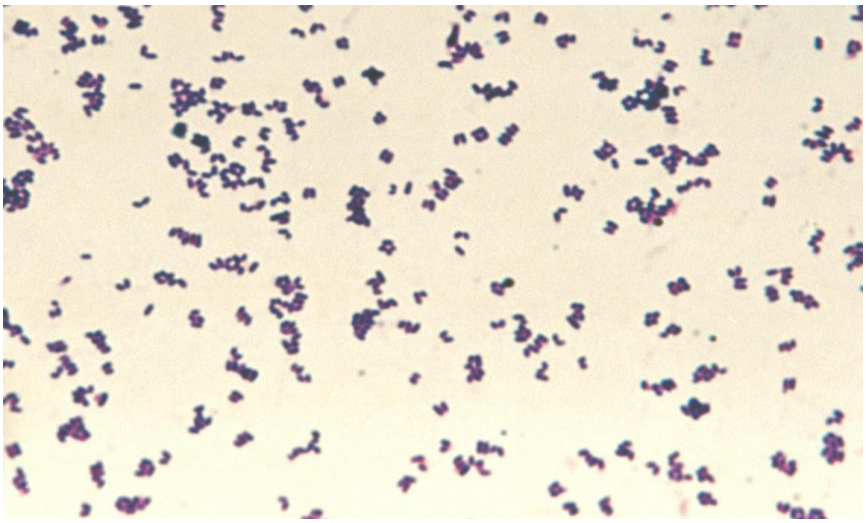


Figure 36 : Corynébactéries typiques coloration de Gram (Gram 2011)

II. Diphtérie :

due à des souches produisant la toxine diphtérique. Ce sont des souches qui hébergent le bactériophage tempéré qui porte le gène tox qui s'intègre dans le génome bactérien.

Elle est responsable des effets systémiques observés lors de la diphtérie.

II.1. Infections pyogènes :

C. diphtheriae produit des enzymes cytolytiques responsables d'angines non compliquées, d'endocardites et de localisations à divers tissus (cutanés, articulaires).

II.2. Corynébactéries non diphtériques

C. resistens: est une nouvelle espèce, isolée d'hémocultures, d'abcès et de prélèvements respiratoires. souvent multirésistante

C. ulcerans: peut être responsable de pharyngites exsudatives et de tableaux pseudodiphtériques. Cette espèce est impliquée dans des diphtéries pour les souches toxinogènes; elle peut être transmise par le lait cru ou les animaux de compagnie.

C. pseudotuberculosis: décrite dans des lymphadénites et pharyngites. La contamination se fait généralement à partir de laits non pasteurisés ou transmise par les animaux de ferme.

C. xerosis: peut être à l'origine d'endocardites et d'infections chez des immunodéprimés.

C. pseudodiphteriticum: , espèce surtout isolée à partir de la gorge, a été signalé dans des endocardites, notamment survenant sur valves. Elle peut être responsable de pneumonies, bronchites.

II.3. Diphtérie, pathologie

Infection strictement humaine transmise par les malades ainsi que par des porteurs sains. Le mode de transmission est surtout oral mais aussi à partir d'un portage cutané.

La période d'incubation est de 1 à 10 jours. Le début commence par une sensation de malaise général, douleur pharyngée et fièvre.



Figure 37: La Diphtérie : pathogénie à gauche et diphtérie Nasopharynx : formation de pseudomembranes à droite (Gram 2011).



Figure 38: Diphtérie cutanée : se présente comme des pseudomembranes nécrotique, mais les conséquences à distance sont plus rares (Gram 2011).

II.4. Diphtérie, effets toxiniques :

La toxine provoque une myocardite avec possibilité de troubles de la conduction cardiaque et une neuropathie périphérique avec paralysie réversible des membres. Le pouls est lent et le patient est confus. La mortalité est variable, de 3 à 30 % des patients

Effets systémiques causés par les souches hébergeant le phage ß porteur du gène *tox* codant une exotoxine, Myocardite, Atteinte neurologique (paralysie des nerfs crâniens et périphériques, Syndrome hémorragique et insuffisance rénale=>tableau de toxémie diphtérique

III. Diagnostic de la diphtérie

III.1. Prélèvements

Un prélèvement de gorge doit être pratiqué devant toute angine à fausse membrane.

À un écouvillonnage (plusieurs écouvillons) à la périphérie de la fausse membrane (amygdales, voile, luette), plus rarement à un écouvillonnage nasal

À un prélèvement de fausse membrane à la pince. Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai.

III.2. Diagnostic bactériologique

III.2. a. Examen microscopique : Bacille Gram + en massue (non différencié d'autres corynébactéries) de 1 à 8 µ m/0,3 à 0,8



Figure 39: Aspect en massue d'une corynébactérie en microscopie électronique (Gram 2011).

III.2. b. Coloration de Gram

C. diphtheriae apparaît Gram positif, mais les bactéries sont très facilement décolorées par l'alcool.

On peut observer la morphologie décrite sur l'examen des frottis avec des groupements caractéristiques en palissade, lettres chinoises ou romaines.

III.2.c. Isolement et culture :

Peu exigeant cultive sur TS et MH +/- sang de mouton, milieu spécifique (cytéine-tellurite, milieu de Tinsdale) colonies noires entourées d'un halo noir

Milieu de Loeffler : non sélectif -croissance rapide

Les cultures seront observées sur 48 heures, mais sur milieux riches, des colonies peuvent apparaître en 16 à 18 heures.

III.2.d. Diagnostic d'espèce

Les colonies de *C. diphtheriae* ont un diamètre de 1 à 3 mm, sont lisses, grisâtres et crémeuses, entourées d'un halo de β -hémolyse sur gélose au sang.

On distingue, sur gélose au tellurite, trois types de colonies pouvant faire évoquer différents biotypes :

Gravis : grosses colonies « R » crénelées à mamelon central ;

Intermedius : petites colonies lisses ou rugueuses ;

Mitis : grosses colonies « S » bombées et brillantes.



Figure 40: aspect carracterestiques des colonies de *Corynebacterium diphtheriae* sur milieucytéine-tellurite, milieu de Tinsdale colonies noires entourées d'un halo noir (photo anonyme).

III.3. Méthodes d'identification et diagnostic différentiel

III.3.a. Méthodes biochimiques :

Activité enzymatique : uréase-gélatinase-nitrate réductase-hydrolyse de la gélatine…

Lipophilie

Pigmentation

Chimiotaxonomie : étude des composants de la paroi (longueur des chaînes carbonées des acides mycoliques).

Méthodes génomiques(PCR)

Tableau 7 Biotypes de *Corynebacterium diphtheriae*.

	Lipophilie	***Nitrate réductase***	***Fermentation glycogène***
Gravis	-	-	+
Intermedius	+	-	+
Mitis	-	+	-
Belfanti	-	-	-

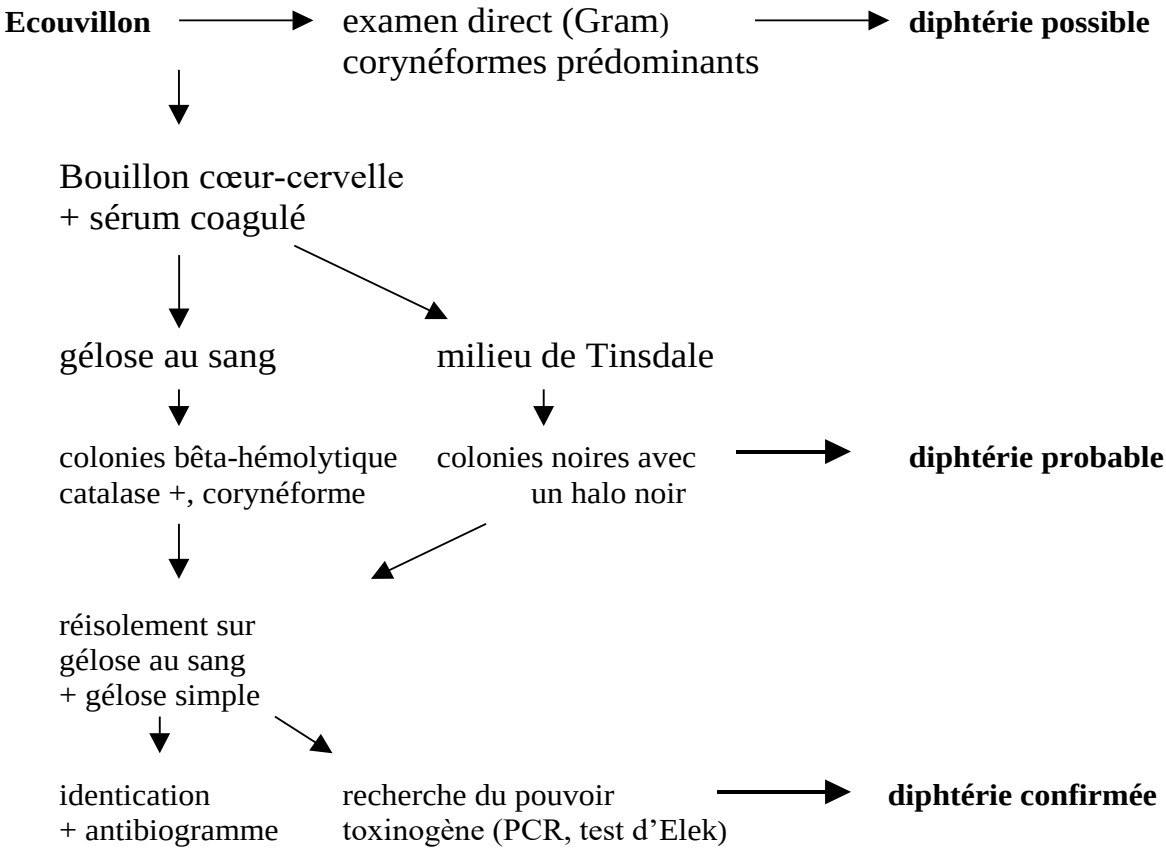


Figure 41: Schéma général du diagnostic bactériologique de C. diphtheriae (Gram 2011).

Toxine diphtérique (Recherche de la toxine)

In vivo effet pathogène chez le cobaye (2 animaux injection en sous cutanée d'une suspension de la souche à tester), l'un reçoit un sérum antidiphtérique en I.P, mort en 2 3 jours du cobaye non immunisé.

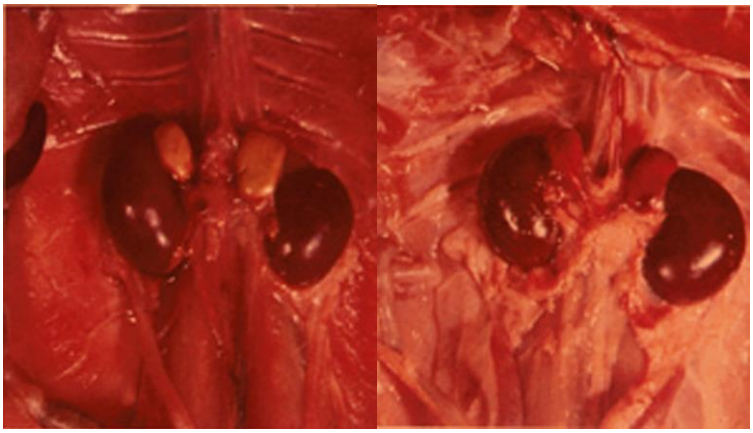


Figure 42 : Autopsie de cobaye après inoculation par voie sous-cutanée d'une culture de C. diphteriae toxinogène. À gauche, animal protégé par antisérum (pas d'hémorragie des surrénales). À droite, cobaye non protégé (hémorragie des surrénales) (Gram 2011).

Test d'immunoprécipitation ou test d'Elek

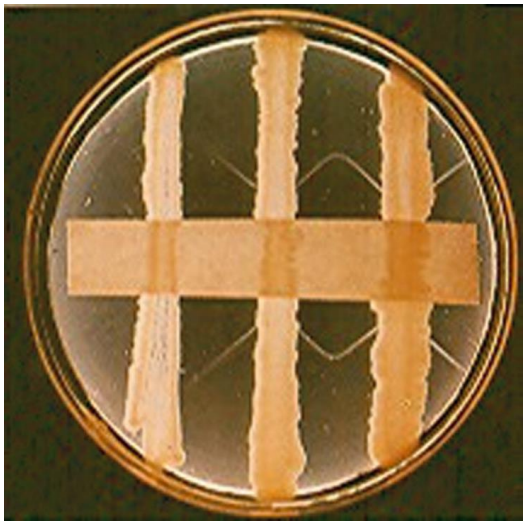


Figure 43: Test d'Elek. De gauche à droite : souche de référence toxine –, souche à tester toxine +, souche de référence connue toxine +. Effet cytopathogène sur cellules vero (Gram 2011)

Amplification génique (gène *tox)* à partir du prélèvement (en cours au CNR)

Sensibilité aux antibiotiques

Valeurs seuils identiques à celles de streptocoque

Méthode diffusion en gélose (M.H. au sang)

Sensible aux ß-lactamines, glycopeptides. Variable pour macrolides, tétracyclines et rifampicine. Resistance à la fosfomycine.

References

Archambaud, M, and D Clave. 2008. "DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DIRECT D ' UNE INFECTION Les Prélèvements , Principales Bactéries En Danielle CLAVE." : 1–37.

Bébéar, C, and C M Bébéar. "C. Bébéar, C.M. Bébéar."

Bingen, E. "Analyse Bactériologique Des Selles."

Colobert, L. 1967. "La Biologie Moléculaire." *La Presse medicale* 75(31): 1623–24.

Comit, Le, and Canada Ottawa. 2006. "Document Technique Les Bactéries Pathogènes d ' Origine Hydrique : Micro-Organismes Préoccupants Courants et Émergents." *Techniques*.

Denis, F, P Bidet, and E Bingen. 2011. "Bacilles à Gram Négatif Aérobies et Aéro-Anaérobies." *Bactériologie Médicale*: 331–427.

Fièvre, La et al. 2007. "Marion DEBIN." *Année*: 2007–3.

Galmiche, A., and P. Boquet. 2001. "Toxines Bact??Riennes: Facteurs de Virulence et Outils de Biologie Cellulaire." *Medecine/Sciences* 17(6–7): 691–700.

Garnier, F., M.-C. Ploy, and F. Denis. 2011. "Cocci à Gram Négatif." *Bactériologie Médicale*: 321–30.

Gram, Bacilles. 2011. "Bacilles à Gram Positif (à l'exception Des Anaérobies)." *Bactériologie Médicale*: 443–74.

Leishmanioses, L E S. 2012. "Pour l ' Obtention Du Doctorat En Pharmacie." *These*.

Lucas, F et al. 1991. "Les Ent ´ Erotoxines Bact ´ Eriennes : Structure , Mode d ' Action To Cite This Version :"

Mariani-Kurkdjian, P., and E. Bingen. 2011a. “Diagnostic Bactériologique et Suivi Biologique Des Méningites Bactériennes.” *Bactériologie Médicale* (Cmv): 159–66.

P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen. 2011b. “Prélèvements de La Sphère Oropharyngée.” *Bactériologie Médicale*: 215–21.

Martin, C., and F. Denis. 2011. “Mycobactéries.” *Bactériologie Médicale* 3: 507–35.

Ploy, M.-C., and F. Denis. 2011. “Orientation Générale.” *Bactériologie Médicale*: 283–85.

Ploy, M, and C Martin. “Liquides d‘Épanchement.”

Vandepitte, J. “Fact6riologie Techniques de Base Pour Le Iaboratoire.”