

Examen bactériologique des prélèvements génitaux

I) Introduction :

- L'examen bactériologique des prélèvements génitaux est fréquemment demandé au laboratoire d'analyse médicale. Le diagnostic n'est pas toujours aisé et seule la connaissance parfaite de la microbiologie de l'appareil génital de la femme et des risques de contamination de l'appareil génital de l'homme, permet de poser le diagnostic correctement.
- Cette connaissance permet une meilleure interprétation des résultats de la culture en distinguant les agents pathogènes qui peuvent être spécifiques ou non spécifiques, à transmission sexuelle, et les agents pathogènes probables qui peuvent être incriminés si leur croissance est abondante et si les premières ne sont pas isolées.

- L'organisation mondiale de la santé (OMS), recommande l'utilisation du terme Infection Sexuellement Transmissible (IST) plutôt que maladies sexuellement transmissibles (MST) pour prendre en compte la fréquence des formes asymptomatiques.
- Selon l'OMS, 250 millions de cas d'IST surviennent chaque année dans le monde, avec des conséquences qui engagent le pronostic fonctionnel (stérilité tubaire) ou vital (Sida).

II) Diagnostic bactériologique de l'infection génitale chez l'homme :

- Le laboratoire participe au diagnostic des infections génitales suivantes :
sypphilis, chancre mou, maladie de Nicholas Favre, gonococcie, les urétrites non gonococciques etc....
- Selon l'orientation clinique, le prélèvement sera effectué à des niveaux variés :
 - Chancre pour la syphilis et le chancre mou.
 - Urètre pour la gonococcie et les urétrites non gonococciques.
 - Ganglions pour la syphilis, la maladie de Nicholas Favre et le chancre mou.

A) Chez l'homme

1/Ulcération :

- Syphilis : *T.Pallidum*
- Chancre mou : (*H. ducreyii*)
- Lymphogranulomatose vénérienne (*Chlamydia trachomatis*)

2/Ecoulement :

- Gonococcie
- Infection à Chlamydiae
- Infection à Mycoplasme
- Candidose
- Trichomonas

B/Chez la femme

1/Ecoulement ou leucorrhée

- 1-Vaginité à *Trichomonas vaginalis*
- 2-Vaginité à *Candida albicans*
- 3-Vaginité non spécifique à *Gardnerella vaginalis*
- 4- Vaginite *Neisseria gonorrhoeae*
- 6- Vaginite à *Streptococcus agalactiae* ou du groupe B
- 7- Vaginite à *Listeria*
- 8- Vaginite à entérobactérie
- 9- Infection à *Chlamydiae*
- 10- Infection à *Mycoplasma*

2/Ulcérations :

- Syphilis
- Chancre mou
- Lymphogranulomatose vénérienne

a) Les ulcérations :

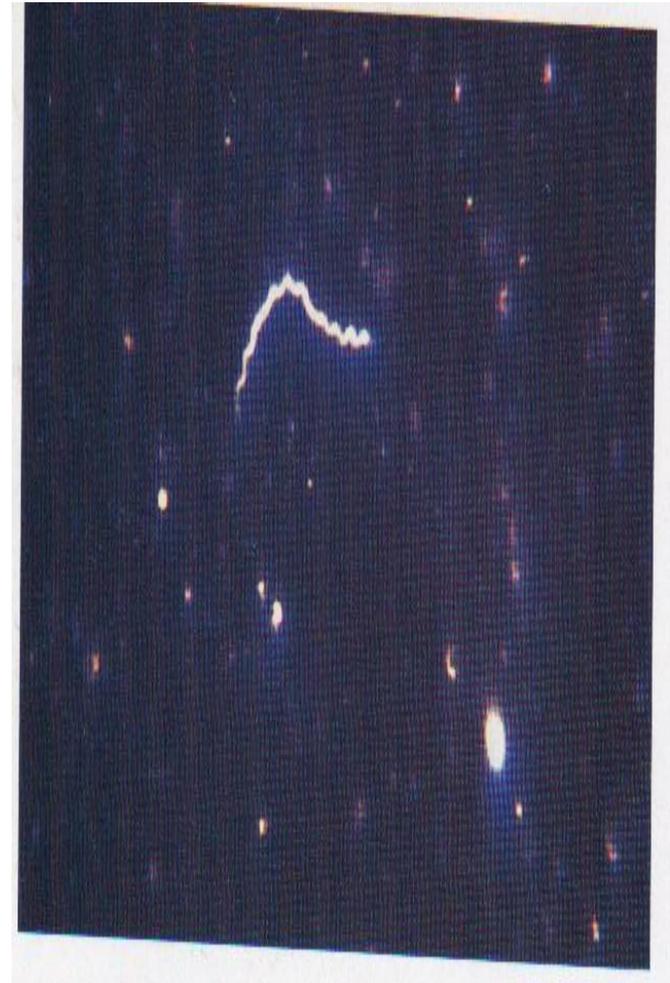
1/ Diagnostic de la syphilis (IST) :

- Le chancre syphilitique, **ulcération indurée**, non douloureuse, est assez facilement reconnue par le clinicien et est dû à

Tréponéma pallidum.



- Le prélèvement du chancre doit être fait avant tout traitement antibiotique ou antiseptique, par la personne qui effectuera l'examen, car aucun transport n'est possible (le prélèvement doit être fait au laboratoire).
- Le diagnostic est uniquement direct : l'examen au **microscope à fond noir de la sérosité du chancre** recueillie par des moyens variés, vaccinostyles, ose, scalpel...
- L'examen au microscope à contraste de phase est possible. Le grossissement à utilisés : X 400 objectif à immersion (X1000)
- Le germe se présente sous forme de filament finement spiralés en ressort (spirochètes) **mobiles par des mouvements de va et vient.**



- Il n'y a **pas de culture possible** pour ce germe.
- La recherche d'anticorps est indispensable et systématique (sérologie)
- La syphilis étant souvent associée à la gonococcie, la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* doit être systématique.
-

a) Les ulcérations :

2/Le chancre mou : (IST)

- Le chancre mou est dû à *Hemophilus decreyii*. La présence d'une ulcération génitale le plus souvent unique, très contagieuse, non indurée (à différencier du chancre syphilitique), accompagnée d'une adénopathie inguinale volumineuse et douloureuse en sont les symptômes classiques.
- Le bubon évolue spontanément vers la suppuration et la fistulisation. Une syphilis associée doit être recherchée systématiquement.
- **Le prélèvement :**
- Il doit s'effectuer au niveau de la zone de décollement périphérique, en grattant sans faire saigner, avec une curette ou un écouvillon d'alginate.
- La ponction du bubon s'impose. Elle doit être pratiquée à l'opposé du point déclive. Elle permet de retirer quelques gouttes de pus jusqu'à plusieurs millilitres, tant dans un but diagnostique que thérapeutique, car elle évite la fistulisation.

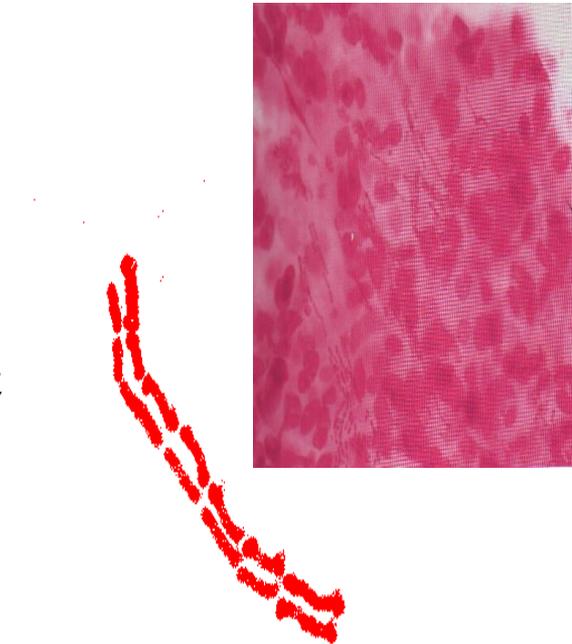
- **L'examen direct :**

La mise en évidence *d'Hemophilus ducreyii* est délicate. C'est un bacille qui prend mal le Gram. Le frottis réalisé avec la sérosité du chancre ou le pus du bubon doit être coloré au bleu de méthylène ou à la coloration de Giemsa, car la coloration de Gram ne permet pas de reconnaître ce bacille.

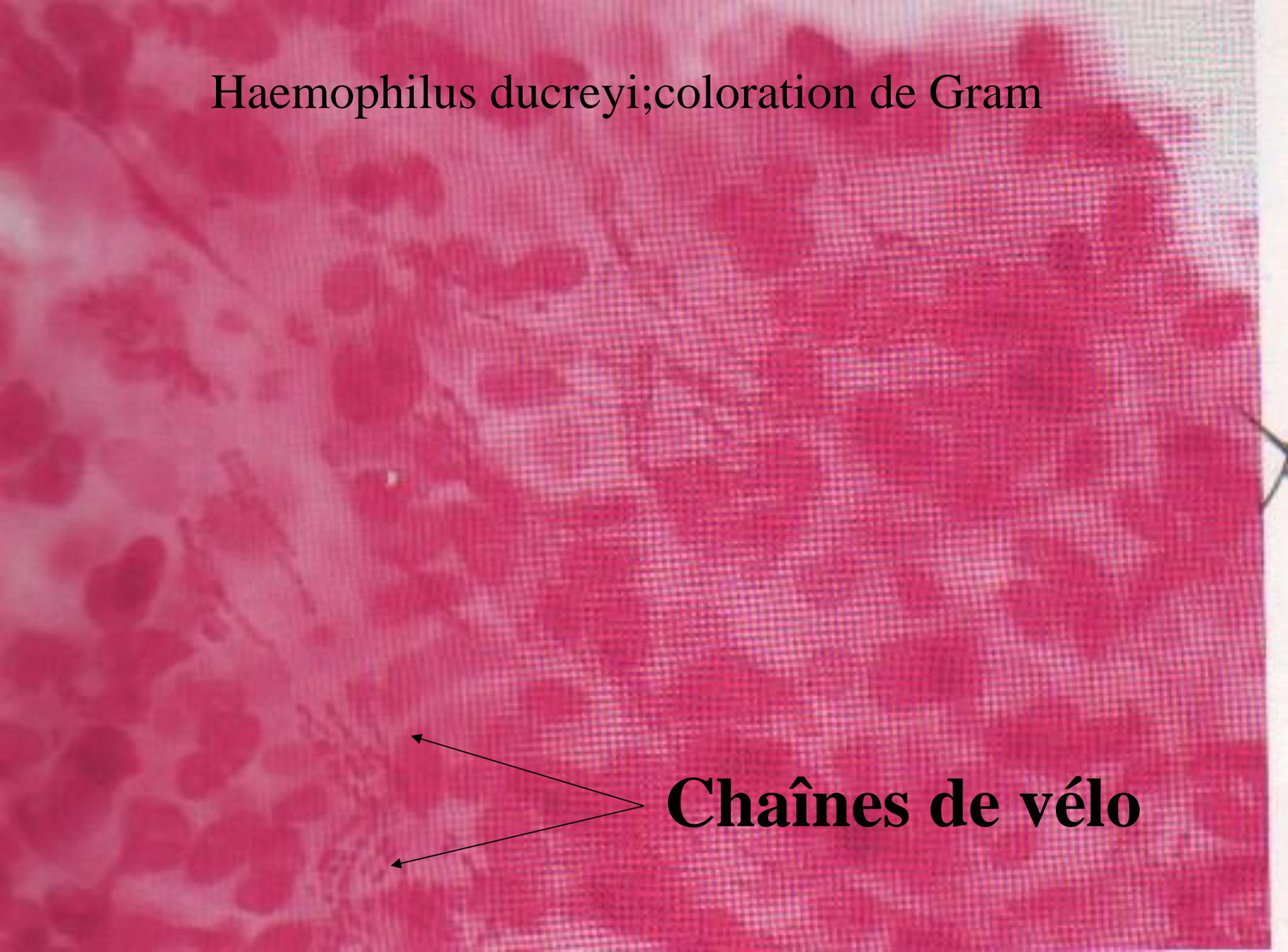
- Sur le frottis examiné à l'immersion (X100) la recherche de **Coccobacilles à coloration bipolaire, à bouts arrondies, en épingle de sûreté intra ou extra cellulaire**, au sein parfois d'une flore abondante de surinfection, est longue
- Leur groupement en bancs de poisson, voir en **amas de longues chaînes parallèles** est caractéristique (aspect dit en chaînes de vélos).
- **Mise en culture :**

Culture difficile, de multiples méthodes ont été proposées :

- gélose trypticase-soja au sang cuit.
- gélose au sang cuit + 1% d'isovitalex.



Haemophilus ducreyi; coloration de Gram



Chaînes de vélo

3/Maladie de Nicholas Favre :

- Ou **lymphogranulomatose vénérienne** est une IST due à *Chlamydia trachomatis*, sérotypes L1, L2, L3.
- La période d'incubation peut varier de quelques jours à un mois.
- Trois phases sont décrites :

a/phase primaire : est généralement une lésion génitale siégeant sur le pénis ou le gland chez l'homme et le vagin ou les lèvres chez la femme. Cette phase peut passer inaperçue, car la lésion est indolore et évolue rapidement vers la guérison. Elle ressemble à la lésion herpétique.

b/Phase secondaire : est marquée par une atteinte ganglionnaire. Les ganglions apparaissent 1 à 6 mois après la lésion primaire. Ils sont inguinaux, unilatéraux, le plus souvent douloureux et évoluent là aussi vers la suppuration puis vers la fistulisation à la peau.

C/ Phase tertiaire ou phase chronique se caractérise par la formation de sclérose :

- Cette maladie coexiste souvent avec une gonococcie ou une syphilis.
- L'isolement de *Chlamydiae trachomatis* se fait sur œuf de poule embryonné ou sur culture cellulaire.

b)- Les écoulements : ou urétrites

- L'urétrite est une inflammation de l'urètre, définie par des critères cytologiques chez un patient n'ayant pas uriné depuis deux heures. Elle peut être considérée comme une urgence thérapeutique, du fait de sa contagiosité et de la gravité de ses complications.
- **Le diagnostic est évoqué** devant un écoulement méatique purulent ou spontané en dehors des mictions, très douloureux, associé à des brûlures mictionnelles.

Mais le plus souvent, la symptomatologie est beaucoup moins franche : écoulement uniquement matinal, méat collé, brûlures mictionnelles, prurit, dysurie.

- **Le diagnostic est confirmé par l'examen direct.** Le frottis est anormal s'il existe plus de 5PN/ champ au grossissement 100.
- L'examen cytobactériologique du 1^{er} jet centrifugé est anormal si l'on observe plus de 10PN/champ au grossissement 40, dans le culot de centrifugation.
- Le frottis urétral est moins performant que l'étude du premier jet urinaire. Il est anormal dans 75% des urétrites gonococciques et 25 % des urétrites à chlamydia, et le 1^{er} jet urinaire est anormal dans 95% des urétrites gonococciques et 75% des urétrites à Chlamydia.
- **Le diagnostic étiologique :** *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* et *Mycoplasma génitalium* sont à eux trois responsables de plus de 60% des urétrites. Chez l'homme, une grande partie restant de cause inexplicée. La répartition de chacun de ces agents pathogènes est variable, selon les pays, et dans un même pays, selon la région. Parmi les *Mycoplasmes*, la responsabilité de *Mycoplasma génitalium* est certaine .Celle des autres mycoplasmes est plus discutée

1) Diagnostic de la gonococcie : (IST)

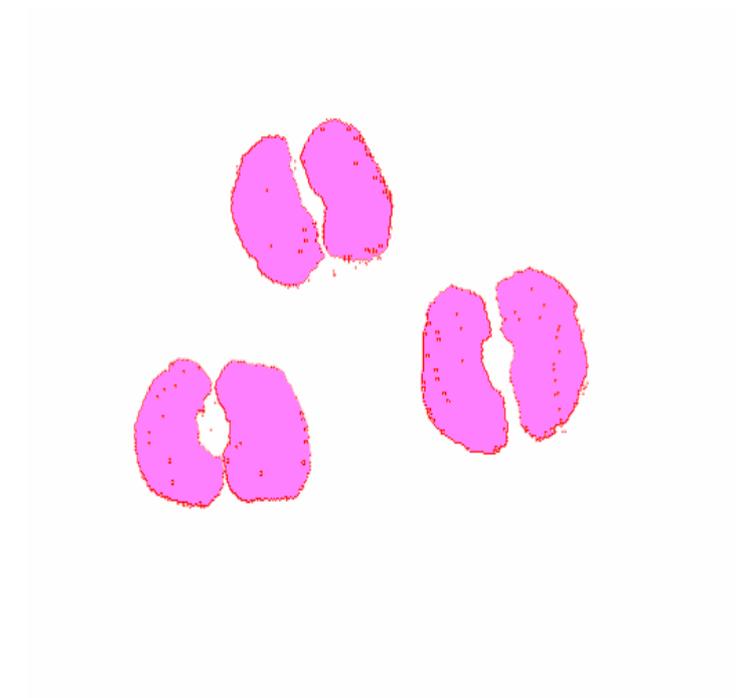
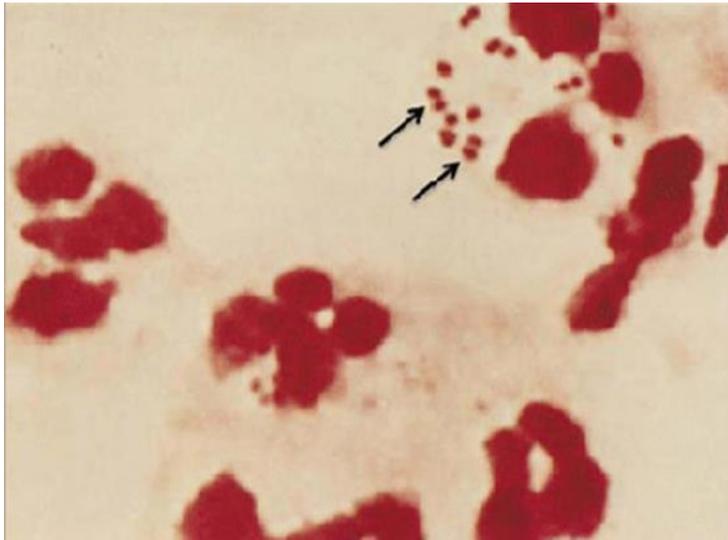
- La gonococcie ou blennorragie est dû à *Neisseria gonorrhoeae*.
- L'incubation est de 3 à 5 jours parfois elle peut être plus longue. Il s'agit le plus souvent d'une urétrite antérieure aiguë mais il existe des formes frustes asymptomatiques.

- **Prélèvement :**

- Le prélèvement se fait par écouvillonnage au niveau des lésions urétrales ou du pus d'urétrite, parfois d'un liquide prostatique.
- Le prélèvement doit être fait soit à l'aide de 2 écouvillons (l'un pour l'examen direct, l'autre pour la culture) soit à l'Öse de platine avec laquelle le frottis sera effectué juste après le prélèvement.

- **L'examen direct :**

Il précède la mise en culture, étaler l'écouvillon sur une lame (ou le prélèvement à l'Öse de platine) et faire une coloration de Gram à la recherche de *cocci gram négatif en grains de café intra cellulaire*, ou une coloration au bleu de méthylène.



- **Mise en culture :**

Elle se fait à 35° C sous CO₂ sur gélose au sang cuit+ VCN inhibant les germes contaminant et sur GSC simple (pour les gonocoques sensibles). On observe les boîtes après 24 à 48 heures d'incubation à la recherche de colonies petites (< 1mm) et brillantes.

- Le test à l'oxydase permet une première approche de l'identification. Les colonies oxydase positive sont ensemencées sur sang cuit et identifiées par l'étude de la fermentation des sucres. (Glucose +, maltose-, fructose-, saccharose-).

- **Un antibiogramme** et une recherche de bêta lactamase (à l'aide de céphalosporine chromogène) sont effectués, on peut utiliser des disques de **cefinase**, selon le protocole du fabricant.



1) Diagnostic des urétrites non gonococcique (UNG)

a) U N G à *Chlamydiae trachomatis* : (IST)

- La période d'incubation peut aller de 2 jours à 2 mois. Il peut s'agir :
 - **d'une forme aiguë** : elle présente la même allure qu'une urétrite gonococcique avec miction douloureuse, écoulement purulent abondant, accompagné parfois d'hémorragie.
 - **D'une forme subaiguë** : la plus fréquente. Les douleurs sont peu marquées. Le patient se plaint d'un écoulement urétral non purulent plutôt visqueux.
- **Prélèvement** : Les muqueuses infectées, prélevées par un écouvillonnage ou mieux par raclages, ou sur les culots urinaires sont placés dans un milieu de transport spécifique et conservés à 4°C La mise en culture se fait sur œuf de poule embryonné ou sur culture cellulaire.

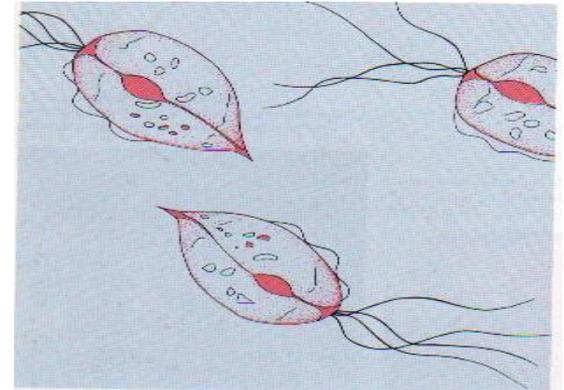
- **Examen direct : Recherche du germe par IF (Immunofluorescence)**
 - La lecture est difficile, le nombre d'erreur par défaut ou par excès diminue avec l'expérience et la qualité du prélèvement.
- **Isolement du germe** : Se fait au niveau de laboratoires spécialisés, des règles précises de prélèvement et de transport sont dictées par la fragilité de *Chlamydia trachomatis*. La fréquence des résultats faussement négatifs exige la recherche simultanée d'anticorps.
- **La PCR du 1^{er} jet** : est devenue l'examen de référence
- **Le sérodiagnostic** : est inutile du fait d'un manque de sensibilité(en cas d'urétrite non compliquée) et d'un manque de spécificité (présence d'anticorps pouvant être la conséquence d'une infection ancienne ou d'une infection à *Chlamydia* d'un autre sérotype).

- **b) UNG à *Mycoplasma hominis* ou *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma génitallium***
- *M. hominis* et *U. urealyticum* sont observés à l'état saprophytes chez de nombreux sujets masculins ou féminins n'ayant aucune affection-géno-urinaire clinique décelable.
- Mycoplasme Hominis est considéré comme responsable d'urétrite non ou post gonococcique.
- Il en est de même pour *Ureaplasma* dont le rôle exact est encore plus difficile à mettre en évidence.
- Dans ces 2 affections, seul l'isolement associé à une montée significative du taux d'anticorps est la preuve de leur participation à l'infection.
- Il faut savoir par ailleurs que seule une culture positive à une dilution $>10^4$ Unité changeant couleur (UCC) par millilitre est prise en considération.
- *Mycoplasma génitallium* est le plus pathogène des Mycoplasmes chez l'homme (15 à 35% des UNG) mais son diagnostic relève seulement de la PCR. Sa recherche est indiquée en cas d'urétrite trainante ou résistant au traitement.

- **Prélèvement** : par écouvillonnage de l'urètre
- **Isolement des Mycoplasmes** : Leur culture est délicate à effectuer et est réservée à des laboratoires spécialisés. Les prélèvements doivent êtreensemencés rapidement ou être conservés dans des milieux de transport spécifiques contenant notamment 0.5% d'albumine et 200 à 400 unités de pénicilline G par millilitre, puis placés à 4°C au maximum 4 heures.
- **Culture sur milieux (Milieu DUO de Biorad)** : milieu liquide, basé sur le changement de couleur (jaune à rose fuchsia) lorsqu'il y a une croissance de mycoplasme permet la numération $> 10^4$ unités formant colonie qui est le seuil de pathogénicité et l'identification des *M. Hominis* et *U. urealyticum*
- **Antibiogramme** : sur milieu **SIR** permet de tester les antibiotiques actifs sur le Mycoplasmes (**érythromycine.**)

c) UNG à *Trichomonas vaginalis* :

- L'homme est le plus souvent porteur sain mais il peut faire une urétrite dû à *T. vaginalis*.
- Diagnostic : Examen à l'état frais du culot de centrifugation du 1^{er} jet urinaire. La culture n'est pas effectuée en routine.



d) UNG à *Candida albicans* :

Elle est peut fréquente chez l'homme qui est le plus souvent porteur sain.

e) UNG à bactéries pyogènes

Streptocoques, *Hemophilus* et *Gardnerella vaginalis* peuvent être à l'origine d'urétrite bactérienne .Leur pathogénicité est retenue s'il existe une flore monomorphe et une culture supérieure à 10^4 UFC/ml

II) Diagnostic de l'infection génitale chez la femme :

Le diagnostic positif :

L'examen clinique et gynécologique évoque facilement le diagnostic .Il précise les différents niveaux lésionnels et les caractères de l'écoulement vaginal (consistance épaisseur, couleur, adhérence aux parois vaginales, odeur éventuelle).

- Une vulvo-vaginite se traduit par une inflammation vulvaire et vaginale, accompagnée de sensation de brûlures, d'un prurit vulvaire, d'un œdème et d'érosions locales, de dysuries et de douleurs pelviennes
- Une cervicite, état inflammatoire du col de l'utérus est facile à diagnostiquer, quand celui-ci est accessible à l'examen au spéculum. Elle se traduit par un col utérin érythémateux, fragile, saignant au contact. L'examen de la glaire pathologique permet de distinguer une glaire purulente, mucopurulente ou opaque.

- **Le diagnostic étiologique**

- 1) Etiologies non infectieuses**

Sont nombreuses :

- hormonales (grossesse, post-partum, préménopause, post-ménopause, prépuberté...)
- caustiques (cosmétiques, produits d'hygiène, de nettoyage, sous vêtements, douches vaginales, corps étranger...)
- allergiques (eczéma de contact au latex des préservatifs)
- ou correspondant à des localisations génitales de dermatoses (eczéma, psoriasis)
- il existe également des cervicites d'origines traumatiques, post abortives, hormonales, ou caustiques.

- 1) Etiologies infectieuses**

- Elles sont plus nombreuses que celles des urétrites chez l'homme : gonocoque, chlamydia trachomatis, Mycoplasme (génitalium), Gardnerella vaginalis, Candida albicans, et Trichomonas vaginalis. Elles peuvent être associées entre elles.
- -Vaginose bactérienne et Candidose ne sont pas considérées comme des IST.
- -La pathogénicité des Mycoplasmes est controversée dans les cervico-vaginites. Elle est plus probable dans les endométrites, ou salpingites pour M.génitalium et M. hominis, controversée pour U. urealyticum

1) Démarche diagnostic

Cliniquement, l'examen au spéculum permet de distinguer :

- une vulvo-vaginite (qui oriente vers une candidose, une trichomonose, ou une Vaginose bactérienne)
- une cervico-vaginite (infection gonococcique ou C. trachomatis)
- L'aspect des leucorrhées a également une bonne valeur d'orientation
 - abondante et spumeuses : en cas de trichomonose
 - abondantes et nauséabondes : en cas de Vaginose bactérienne
 - caillebotées : en cas de candidose
- **L'examen cytologique du frottis**,
 - évalue le nombre de PN/champ au grossissement 100, mais il n'y a pas de définition consensuelle de la cervicite.
 - L'examen du frottis vaginal recherche les bacilles de Doderlein. leur présence témoigne d'un respect de la flore vaginale saprophyte, argument contre une IST, le principal problème étant d'individualiser les IST au sein des multiples autres causes de pertes génitales chez la femme.



- Les infections génitales correspondent dans l'immense majorité des cas à des infections dues à :
 - *Trichomonas vaginalis*.
 - *Candida albicans*
 - des infections à germes multiples aero-anaérobies (*Gardnerella vaginalis*) actuellement regroupés sous le nom de vaginite non spécifique (VNS)
 - les vaginites à *Escherichia coli*, *Proteus*, *Streptocoque* etc.... sont observées en général chez les femmes âgées et les malades hospitalisés.
 - les vaginites *Streptocoque agalactiae* (B) à *E. coli K1* et à *listeria monocytogenès* doivent être recherchées systématiquement chez les femmes enceintes à cause du risque d'infection néonatale.

A) Ecoulement ou leucorrhées

Sont définies comme un écoulement vaginal anormal par la quantité, la qualité et l'odeur. C'est un symptôme qui peut être la traduction d'une vaginite souvent associée à une urétrite ou d'une cervicite, les deux pouvant être associées ou cervico-vaginite

1/Diagnostic de la vaginite à *Trichomonas vaginalis* :

- L'infection est caractérisée par des douleurs (brûlures) des pertes jaunâtres, de la dysurie
- **Prélèvement** : Prélever la surface vaginale à l'aide d'une pipette ou d'un écouvillon d'alginate ou de Dacron (jamais de coton)
 - 2 écouvillons sont nécessaires.
- **Le transport** doit être le plus rapide possible.
- **L'examen direct** : Il est possible de diluer (à minima) le prélèvement dans du sérum physiologique.
- *T. vaginalis* est un protozoaire flagellé en forme de poire, doué d'une mobilité frétilante. Utiliser le grossissement 40. On ne recherche pas de *T.vaginalis* par culture ou par coloration.

2/ Diagnostic de la vaginite à *Candida albicans* :

L'infection est caractérisée par un prurit (brûlures vulvaires) et des excoriations érythémateuses des lèvres et de la muqueuse.

- **Le prélèvement** se fait à l'écouvillon.
- **L'examen microscopique** (après coloration au bleu de méthylène) montre des levures et des filaments pseudomycéliens
- **La culture** se fait sur milieu de Sabouraud + Gentamycine/ou Chloramphénicol).
- Le *Candida albicans* est identifié par le test de filamentation (colonies de levures inoculées dans le sérum humain et suivie par l'apparition de filament après 1 heure d'incubation).



3/Diagnostic de la vaginite non spécifique à *Gardnerella vaginalis*

Cette vaginite se signale par des pertes malodorantes (odeur de poisson pourri due à des polyamines libérées par alcalinisation).

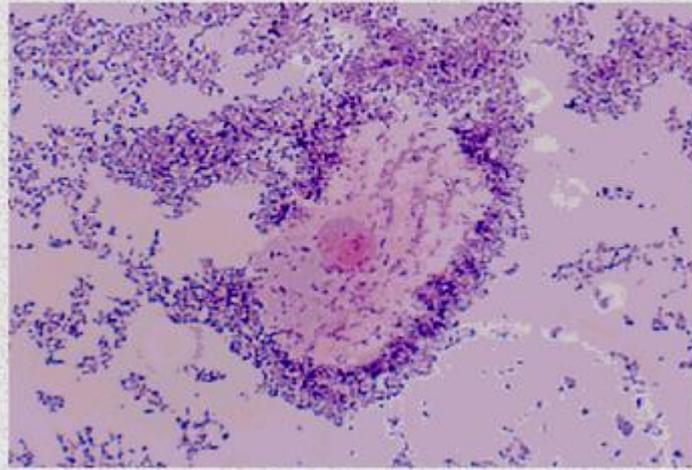
Les symptômes réapparaissent dans 30% des cas malgré le traitement.

- Le diagnostic s'appuie sur :
 - a) Le PH > 4.5 (vérifié au papier PH si sécrétion abondantes)
 - b) Des pertes homogènes et filantes
 - c) L'odeur de poisson caractéristique révélée suite à la dispersion des pertes dans de la potasse à 10% soude
 - d) **Examen Direct** : La présence de Clue cells ou cellules qui sont recouvertes d'une grande quantité de bactérie (en utilisant des colorations type Giemsa, Pick Jacob, Papanicolaou)
 - e) **Culture** : ne jamais effectuer la culture de *Gardnerella vaginalis* pour elle-même, du fait de son absence de signification, si on ne fait pas de numération de germes .De plus *G.vaginalis* n'est pas le seul germe impliqué (association avec les germes anaérobies).

Culture : ensemenecer

- GSC+ VCN (Vancomycine +colistine +Nystatine)
- G S + ANC (Acide Nalidixique + colistine)
- Gélose Mc Conkey ou Hectoen

Clue cell



4/Infections génitales dues à d'autres germes :

a) *Neisseria gonorrhoeae* :

Doit être recherché au niveau de l'**endocol**, dans **les glandes annexes** en cas de **bartholinite**. Du fait de son importance, la recherche est effectuée sur tous les prélèvements par ensemencement sur :

-GSC + VCN : les colonies sont <1mm de diamètre

-GSC : car 3% des gonocoques sont sensibles. Les colonies sont grisâtres, oxydase positives.

b) *Streptocoque agalactiae* ou **B**

Est recherché systématiquement dans les situations suivantes :

-Fièvre chez une femme enceinte

-Menace d'accouchement prématuré ou accouchement prématuré.

-Femme enceinte ayant déjà eu un nouveau-né porteur de streptocoque du

Groupe B

On repère les colonies fines (05) mm transparentes catalase (-), entourée d'une hémolyse de type bêta. L'identification est confirmée par la détermination du groupe sérologique.

a) *Staphylocoque aureus* :

Il est recherché en cas de syndrome de choc toxique (dû aux tampons utilisés pendant la période de menstruation) et par défaut sur les prélèvements venant de **réanimation**

d) *Entérobactéries* :

Elles ne sont à considérer qu'en l'absence d'autres germes et si la culture est abondante.

e) *Listeria monocytogenès*:

La probabilité d'isolement est très faible mais sa pathogénicité impose sa recherche. L'avoir toujours présente à l'esprit.

f) Chlamydia trachomatis :

- Le portage est souvent asymptomatique au niveau des voies génitales, la transmission se fait par contact sexuel. Cet organisme peut être la cause de cervicite et de salpingite aiguë et semble jouer un rôle dans les stérilités.
- Le prélèvement est effectué au niveau de l'**endocol** généralement à l'aide d'un écouvillon ou brosse, l'idéal est d'effectuer le prélèvement au niveau du laboratoire.

g) Mycoplasme hominis et Ureaplasma urealyticum :

- *M.Hominis* serait éventuellement responsable de **vaginites, cervicites, et avortement septiques**. *U.urealyticum* jouerait un rôle identique et aurait une responsabilité dans certaines stérilités inexplicables.

A) Ulcérations :

a) Syphilis :

- Prélèvement et diagnostic se font de la même façon que chez l'homme.

b) Chancre mou

- Le chancre mou se situe en général sur le versant cutané des grandes lèvres, le clitoris, l'anus. Il est beaucoup plus rare chez la femme que chez l'homme, du fait d'une résistance particulière des muqueuses à la pénétration du germe.

B) Interprétation :

Les résultats bactériologiques demandent à être interprétés :

- **Bactéries à pouvoir pathogène indiscutable :**

- Neisseria gonorrhoeae*
- Chlamydia trachomatis*
- Tréponème pallidum*
- Hemophilus ducreyii*

- **Bactéries dont la présence demande à être discutée qualitativement et quantitativement en fonction du contexte clinique :**

- Candida albicans* (>30 colonies)
- Streptocoque agalactiae* chez la femme enceinte en raison du risque d'infection néonatal.
- Mycoplasme* dont le seuil de pathogénicité > 10⁴ UCC/ml
- Entérobactéries
- Staphylococcus aureus* etc....