

Coproculture

Plan :

1. Contextes

- A. Contexte standard
- B. Contextes diagnostiques particuliers

2. Modalités de prélèvement des selles

3. Diagnostic bactériologique

Objectifs :

- Connaître le contexte clinique.
- Maîtriser le diagnostic bactériologique des selles.
- Résoudre le cas clinique.

1. Contextes :

A. Contexte standard : La coproculture ou examen bactériologique des selles, vise à **diagnostiquer les diarrhées d'origine bactérienne.**

L'étiologie bactérienne varie en fonction de l'âge :

❖ **Adulte et enfants de plus de 02 ans :** essentiellement *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* (mais également *Campylobacter spp*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Clostridium*).

La coproculture standard comprend la recherche de *Salmonella* et *Shigella*.

❖ **Enfants âgés de moins de 02 ans :** Réalisation d'une coproculture standard (mêmes bactéries) avec en plus recherche des *Escherichia coli* entéropathogènes (*E.coli* GEI : responsable de gastroentérites infantiles).

B. Contextes diagnostiques particuliers :

- Diagnostic bactériologique des toxi-infections alimentaires.
- Diarrhées post antibiotiques.
- Détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR).
- Recherche de bactéries particulières (dépistage des bactéries entéropathogènes chez les employés de cuisine ; recherche de porteurs sains de *Salmonella*).

2. Modalités de prélèvement des selles :

Prélever les selles :

- Par émission directe dans récipient stérile ou à défaut très propre.
- Par écouvillonnage rectal surtout chez les jeunes enfants : introduire dans le rectum du malade un écouvillon stérile et essayer de ramener le maximum de selles.

Les prélèvements qui ne peuvent parvenir au laboratoire dans un délai de 02 heures doivent être obligatoirement mis à +4°C s'ils ne sont pas dans un milieu de transport. S'ils ont été placés dans un milieu de transport on peut éventuellement le garder dans un endroit frais mais pas plus de 24heures.

La fiche de renseignements doit être dûment remplie.

3. Diagnostic bactériologique :

3.1.Examen macroscopique:

Noter l'aspect macroscopique de la selle : la consistance (solide, diarrhéique, en eau de riz), la présence de glaires, de pus, de sang.

a) Si le prélèvement n'est pas dans un milieu de transport, le mettre en suspension dans de l'eau physiologique. **Lorsque la selle n'est pas liquide** prendre une noisette de la selle et préparer une suspension homogène dans de l'eau physiologique ou eau distillée stérile.

Lorsque la selle est liquide, en prélever un volume correspondant à la moitié d'une pipette pasteur et la mettre dans de l'eau physiologique.

b) Si le prélèvement parvient en milieu de transport, il suffit de bien agiter le tube pour mettre en suspension.

3.2. Examen microscopique:

Il se pratique après coloration de Gram dans le cas de selles liquides.

- ✓ **Etudier la cytologie** : la présence de leucocytes est le signe d'une infection certaine ;
- ✓ **Noter le déséquilibre de la flore** et particulièrement la présence de levures ; dans ce cas ensemencer un Sabouraud + chloramphénicol + actidione.

3.3. Mise en culture :

Il existe de nombreux **milieux d'isolement sélectif et d'enrichissement** pour la mise en évidence des bactéries entéropathogènes à partir des selles.

3.3.1. Recherche des Salmonella, Shigella et E.coli GEI :

❖ Premier jour :

A. Isolement direct :

A partir de la suspension de selles effectuer un isolement à l'aide d'une anse de platine ou (si le prélèvement a été effectué par écouvillonnage) à l'aide de l'écouvillon, sur :

Une boîte de milieu **Hektoen** ou de milieu **S.S** (*Salmonella Shigella*) pour la recherche de *Salmonella* et *Shigella* : **Hektoen direct ou S.S direct.**

Une boîte de **B.C.P** (pourpre de bromocrésol) pour la recherche des *E.coli* GEI quand le patient est âgé de moins de 02 ans : **BCP direct.**

B. Premier enrichissement :

A partir de la suspension du prélèvement, prendre le volume d'une demi-pipette pasteur et l'ensemencer dans un tube de **milieu SFB (bouillon au sélénite):**

SFB I.

Incuber les boîtes et le tube SFB I une nuit à 37°C.

❖ Deuxième jour :

A. Identification des colonies suspectes :

Pour Salmonella et Shigella :

Repérer sur les boîtes d'Hektoen D (direct) **les colonies vertes avec ou sans centre noir** (colonies lactose saccharose négatif). Repiquer au moins 04 colonies sur milieu urée-indole.

Incuber les milieux urée-indole dans un bain-marie à 37°C pendant 04heures : ceci permet d'éliminer les *Proteus* qui ont le même aspect que les *Salmonella* sur milieu Hektoen mais sont urée positive (dans ce cas inutile de continuer l'identification).

Si après ce temps d'incubation l'urée un tube de TSI et un tube LDC et son témoin, incuber tous les tubes (y compris celui de l'urée une nuit à 37°C, à l'étuve.

Remarque: si l'isolement a été effectué sur milieu S.S procéder de la même manière mais en repiquant les colonies roses.

Pour E.coli GEI :

A partir des boîtes de BCP, repiquer chacune de 08 à 10 colonies jaunes (lactose positif) parallèlement sur milieu TSI et milieu urée.

Incuber les tubes une nuit à 37°C à l'étuve.

B. Isolement et 2^e enrichissement (SFB II) à partir du 1^e enrichissement :

A partir du tube de SFB I, effectuer un isolement sur milieu Hektoen ou S.S. (Hn I ou SS I) à l'aide d'une anse de platine ;

Un deuxième enrichissement en ensementant 5 à 6 gouttes du SFB I dans un tube de **SFB II**. Incuber les boîtes et les tubes une nuit à 37°C dans une étuve.

❖ Troisième jour :

A. Identification complète des colonies suspectes repiquées la veille :

1. Identification des colonies lactose-saccharose négatif :

lecture des galeries ensementées la veille

- Si le TSI présente un culot noir (H₂S+) avec gaz pente rouge (Lac-) : l'urée, la TDA et indole sont(-) et LDC(+) il s'agit de **Salmonella non typhoïdique** ou de **Salmonella paratyphi B ou C**.
Procéder à l'identification antigénique.
- Si le TSI présente un culot jaune sans gaz avec un anneau noir "aspect en moustache" (parfois absence de noircissement : H₂S + ou H₂S-) et une pente rouge, Urée , TDA et indole sont négatif et LDC positive : **il s'agit de S.typhi**.
Procéder alors à l'identification antigénique.
- Si le TSI présente un culot jaune avec gaz absence de noircissement et une pente rouge l'urée la TDA l'indole et LDC sont négatif : **il s'agit de Salmonella paratyphi A** ;
Procéder alors à l'identification antigénique pour confirmer le diagnostic ;
- Si le TSI présente un culot jaune sans gaz ni noircissement et une pente rose et que l'urée la TDA et LDC sont négatif : **suspicion de Shigella** ;
Précéder alors à l'identification antigénique.

2. Identification des E.coli GEI :

Chaque tube ensementé doit faire l'objet d'une identification : chaque TSI présentant culot jaune avec gaz une pente jaune sans noircissement et dont l'urée et TDA négatifs et indole (+) fera l'objet d'une identification antigénique à l'aide des sérums anti-E.coli GEI.

B. Lecture des boîtes d'Hektoen I :

Repérage et identification des colonies suspectes retrouvées sur Hn I : leur identification s'effectue comme décrit ci-dessus ;

Isolement sur Hn II à partir du SFB II : incuber les boîtes une nuit à 37°C.

❖ Quatrième jour :

Repérage et identification des colonies suspectes retrouvées sur Hektoen direct.

Un test de sensibilité aux antibiotiques est effectué pour chaque souche isolée.

3.3.2. Recherche des Vibrions cholériques :

❖ Premier jour :

✓ Isolement direct :

A partir de suspension de selles, effectuer un isolement sur **gélose nutritive alcaline et biliée (GNAB d)**. Incuber une nuit à 37°C.

✓ **Premier enrichissement :**

A partir de la suspension de selles, prendre le volume d'une demi-pipette Pasteur et l'ensemencer dans un tube **d'eau peptonée alcaline (EPA I)**.

Le tube sera incubé **6 à 8 heures** à 37°C .

NB : après 08 heures d'incubation, seuls les vibrions vont bien se multiplier en EPA. Le temps d'incubation des tubes d'EPA de 6 à 8 heures doit donc être respecté chaque fois que cela est possible.

❖ **Deuxième jour :**

1. Identification des colonies suspectes :

Sur les boîtes de GNAB repérer les colonies suspectes : colonies plates, transparentes, à contour régulier et bleutées.

A partir de chaque colonie effectuer une recherche **d'oxydase** à l'aide d'une partie de la colonie ; si l'oxydase est positive repiquer le reste de la colonie sur **milieu KIA (Kligler Iron Agar)**.

Incuber une nuit à 37°C.

2. Isolement et 2^e enrichissement à partir de l'EPA I :

A partir du tube d'EPA I, effectuer :

✓ Un isolement sur GNAB I. incuber une nuit à 37°C. Le prélèvement doit être effectué à la surface du liquide ;

✓ Un 2^e enrichissement en prélevant 4 à 6 gouttes prises à la surface du liquide qu'on ensemence dans un tube d'EPA II. **Incuber 6 à 8 heures à 37°C.**

On peut faire une identification antigénique directement à partir de la colonie.

✓ Isolement à partir de l'EPA II . Après une incubation de 6 à 8 heures, effectuer un isolement sur GNAB II en prélevant toujours à la surface du liquide et sans agiter les tubes. Incuber les boîtes à 37°C pendant une nuit.

NB : il est recommandé de prélever à la surface du liquide des tubes EPA et de ne pas les agiter parce que les virbrions cholériques **poussent à la surface du liquide et même forment un voile très riche en germes** (presque à l'état pur) après une incubation d'une nuit.

❖ **Troisième jour :**

1. Identification complète des colonies repiquées la veille :

Pour chaque KIA ensemencé la veille, présentant un culot jaune sans gaz ni H₂S et une pente rose effectuer :

✓ Une réaction d'oxydase et si elle est positive

✓ Une agglutination à l'aise d'antiséurms anti O1 et anti O139

2. Lecture des boîtes GNAB I et GNAB II :

Repérage et identification des colonies

❖ **Quatrième jour :**

Lecture et interprétation des galeries biochimiques ensemencées la veille (revoir cours V.cholerae).

Un antibiogramme est effectué pour chaque souche isolée.

4. Recherche de *Campylobacter* spp dans les selles :

La recherche des *Campylobacter* doit être systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides.

La culture se fait sur **un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Butzler)** en 24 à 48h à 37 °C en atmosphère **micro-aérophile**.

L'examen direct met en évidence **des bactéries présentant une mobilité caractéristique en vol de mouette** lors d'examen microscopique direct en microscope à contraste de phase.

La coloration de Gram met en évidence des **petits bacilles à Gram négatif incurvés**.

Après 48h d'incubation, et en fonction de l'humidité du milieu, on observe des colonies : petites grises convexes à bords réguliers ou des colonies plates muqueuses de forme irrégulière.

Les caractères différentiels permettant l'identification des principales espèces sont représentés dans le tableau suivant :

Espèce	Oxydase	Catalase	Croissance à		Sensibilité à		Hydrolyse de l'hippurate
			25°C	42°C	Acide nalidixique	céfalotine	
<i>C.fetus</i>	+	+	+	-	R	S	-
<i>C.jejuni</i>	+	+	-	+	S	R	+
<i>C.coli</i>	+	+	-	+	S	R	-

5. Recherche de *Clostridium difficile* dans les selles:

Clostridium difficile est un bacille à **Gram positif anaérobie strict sporulé**, à l'origine de colite pseudomembraneuse et de diarrhées post antibiotique.

Plusieurs techniques permettent de le mettre en évidence dans les selles :

5.1. Recherche d'antigènes dans les selles par agglutination ou par méthode immuno-enzymatique.

5.2. Isolement par culture en anaérobiose stricte sur milieux sélectifs contenant de la cyclosérine et de la céfoxitine comme le milieu TCCA.

Les colonies présentent un aspect caractéristique de **verre fritté à la loupe binoculaire** et dégagent une odeur caractéristique de crottin de cheval. L'identification biochimique se fait à l'aide de galeries biochimiques prêtes à l'emploi (API 20A).

5.3. Mise en évidence du pouvoir toxigène : étape indispensable au diagnostic :

- Par PCR sur les colonies ;
- Par le test de cytotoxicité ;
- Par méthode immuno-enzymatique à partir du surnageant d'un bouillon de culture de la souche.

6. Recherche de *Yersinia enterocolitica* dans les selles :

L'enrichissement se fait dans un bouillon incubé (bouillon Rappaport ; bouillon CIN) **pendant 2 semaines à +4° C**, température qui permet encore la multiplication de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* mais qui inhibe celle de la plupart des espèces constituant la coproflores.

L'isolement fera appel à des milieux spécifiques type **CIN cefsulodine-irgasan-novobiocine**. Il est primordial d'incuber les milieux à **25-28 °C** et non à 37°C et de les examiner au bout de 24h et surtout 48h.

Sur milieu CIN les colonies ont un centre rouge sombre et atteignent 2-3 mm de diamètre après 48h d'incubation.

Les caractères biochimiques permettant l'identification de *Y. enterocolitica* **uréase+ très rapide, ONPG+, VP+, ODC+, mobile à 28°C, immobile à 37°C.**

Les recherches sont effectuées à **28°C** sauf l'uréase et l'ONPG qui sont effectuées à 37°C.

Cas clinique :

Mr F. T. 25 ans, est adressé aux urgences pour un syndrome fébrile et des douleurs abdominales s'aggravant progressivement depuis une semaine, au retour d'un voyage de trois mois au Mali (juillet à septembre).

Avant son départ, il a été vacciné contre la fièvre jaune et l'hépatite B, ses vaccins DTP étaient à jour. Il a suivi une prophylaxie antipaludéens.

Il n'a pas été malade pendant le séjour, en dehors de quelques épisodes de douleurs abdominales et de diarrhée durant moins de 48 h, au cours des deux premières semaines, ensuite il s'est très bien adapté au régime local.

Examen clinique : très somnolent mais orienté et cohérent, céphalées frontales, pas de raideur méningée, pas de nausées. Température 40°C, TA 120/60 mm Hg, Abdomen sensible sans défense, discrète hépatomégalie et splénomégalie, une selle liquide depuis l'entrée. Le reste de l'examen semble normal.

Biologie : Hb 12 g/dl, GB 3700/mm³ dont 70 % de PN, Plaquettes 120000/mm³. TP 95 %.

- 1) Quels diagnostics devez-vous évoquer en priorité ?
- 2) Quels examens complémentaires à visée diagnostique demandez-vous en urgence ?
- 3) Une hémoculture est positive avec un bacille Gram négatif à l'examen direct. Quel diagnostic retenez-vous ?

Citez les caractères cultureux et biochimiques de l'agent pathogène ?

Citez le mode de transmission de l'agent pathogène ?

- 4) Quelles précisions ultérieures devez-vous demander au laboratoire de bactériologie ?

- 5) Quelle est votre attitude thérapeutique ?

Le lendemain l'état clinique s'est modifié : tension artérielle 85/53 mm Hg, fréquence cardiaque 110/mn, douleur abdominale intense.

Bilan biologique : GB 15000/mm³ dont 80 % de PN, Hb 14 g/dl, Plaquettes 75000/mm³.

6) Quelle complication devez-vous redouter ?