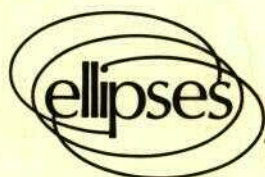


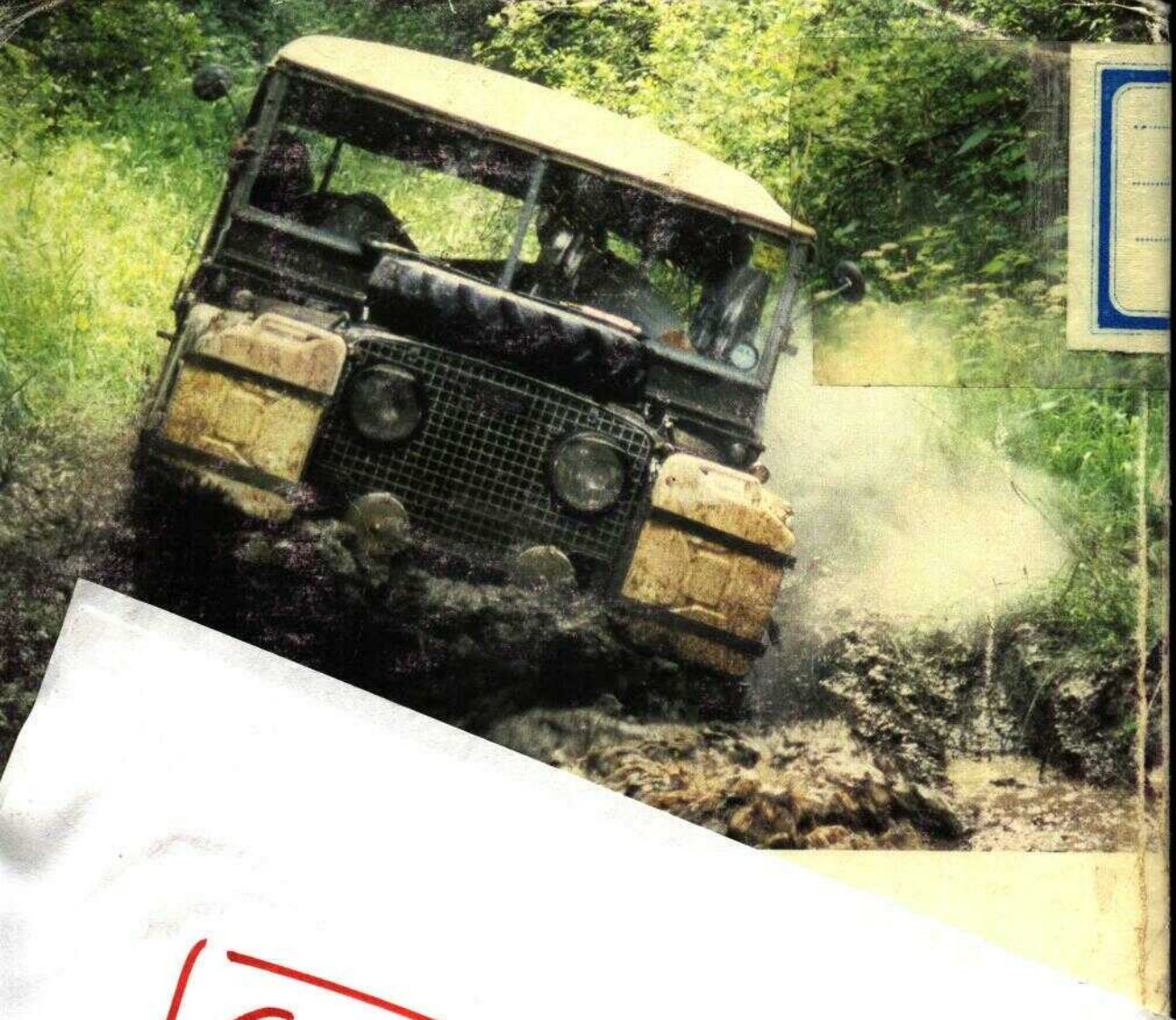
J.-L. AVRIL
H. DABERNAT
F. DENIS
H. MONTEIL



BACTERIOLOGIE CLINIQUE

2^{ème} édition





CENSURE!!
..

BACTERIOLOGIE CLINIQUE

Nous tenons à remercier les laboratoires LEDERLÉ, qui pour cette nouvelle édition, **comme** pour la précédente, ont contribué à la diffusion de cet ouvrage.

BACTERIOLOGIE CLINIQUE

α 0 p 4 / 5 3 4 1

EXCLUS DU PRÊT

Professeur JEAN LOUP **AVRIL**
C.H.U. Rennes

Professeur HENRY **DABERNAT**
C.H.U. Toulouse

Professeur FRANÇOIS **DENIS**
C.H.U. Limoges

Professeur HENRI **MONTEIL**
C.H.U. Strasbourg

2^{ème} édition



Les auteurs remercient les collaborateurs qui ont participé à la correction de cette nouvelle édition : Y. PIEMONT, A. LE FAOU, B. JAULHAC, B. RIOT (qui ont profondément remanié certains chapitres), R. MINCK, J.M. SCHEFTEL, D. RAOULT, C. DELMAS, M. MOUNIER et P.Y. DONNIO.

Nos remerciements s'adressent également au Professeur J. ORFILA, au Professeur A.L. COURTIEU qui nous a fourni les photographies en microscopie à balayage et à Ph. LEBERT, M.F. PRERE, Ph. GAUTIER et M. SAUZIÈRE, auteurs de nombreuses photographies.

Nous associons à ces remerciements les Sociétés BIOMÉRIEUX et Diagnostics-PASTEUR qui nous ont autorisés à reproduire certains de leurs documents.

Nous remercions particulièrement Madame M. HOEHN qui a assuré à Strasbourg la lourde charge du secrétariat de cette deuxième édition.

La loi du 11 mars 1957 n'autorise que les "copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective". Toute représentation ou reproduction, Intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'éditeur, est illicite.

© **COPYRIGHT 1992**

EDITION MARKETING
EDITEUR DES PREPARATIONS
GRANDES ECOLES MEDECINE
32, rue Bargu» 75015 PARIS

ISBN 2-7298-9218-4

AVANT-PROPOS

Les antibiotiques et l'hygiène n'ont pas fait disparaître la pathologie infectieuse. La fréquence et le pronostic de fléaux comme la typhoïde, la tuberculose ou la poliomyélite ont changé. Mais une nouvelle pathologie infectieuse existe.

De nouveaux agents infectieux ont été découverts récemment. Citons les *Legionella* (1977), *Borrelia burgdorferi* (1982) et récemment *Chlamydia pneumoniae* et *Afipiafelis*. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (V.I.H.) est elle-même à l'origine de nombreuses infections bactériennes nosocomiales : salmonelloses, nocardioses, tuberculoses et infections à mycobactéries atypiques.

Beaucoup de malades qui n'auraient pas survécu il y a quelques décennies se trouvent aujourd'hui, grâce au progrès de la médecine et de la chirurgie, dans nos hôpitaux. Ces malades, du fait de leur pathologie ou d'un traitement immuno-suppresseur, sont particulièrement sensibles aux infections. Finalement, c'est bien souvent d'infections nosocomiales dues à des bactéries opportunistes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* etc.), non pathogènes pour un individu sain, qu'ils meurent.

L'isolement puis l'identification d'une bactérie pathogène est un acte particulièrement satisfaisant car, à lui seul, il apporte un diagnostic étiologique et permet un traitement parfaitement adapté.

On connaît la relation qui existe entre la précocité du traitement d'une maladie infectieuse et le succès thérapeutique. Pendant longtemps, les bactériologistes ont été confrontés à une donnée fondamentale de la physiologie : dans les meilleurs des cas il faut 18 heures pour qu'une souche bactérienne forme des colonies. Les techniques progressent et permettent dans certains cas d'éviter cet écueil. C'est un souci constant en bactériologie clinique de raccourcir le délai de la réponse du laboratoire et par là même le délai avec lequel le malade reçoit un traitement adapté. L'automatisation y contribuera.

L'objectif de cet ouvrage est de présenter de façon synthétique, mais précise et sans vouloir être exhaustif, les données classiques comme les données les plus récentes concernant le diagnostic, le traitement et la prévention des infections bactériennes. Ce livre, *Bactériologie Clinique*, était initialement destiné à être un outil de travail pour nos collaborateurs, internes en biologie. Notre souhait aujourd'hui est qu'il soit utile à tous ceux qui sont concernés par l'infection.

Les auteurs.

TABLE DES MATIERES

Section I	— Les cocci à Gram positif	9
Chapitre I	— <i>Staphylococcus</i>	9
Chapitre II	— <i>Streptococcus. Enterococcus</i>	31
Chapitre ni	— <i>Streptococcus pneumoniae</i>	55
Section II	^t — Les Neisseriaceae	67
Classification des <i>Neisseriaceae</i>		67
Chapitre IV	— Le genre <i>Neisseria</i>	68
Chapitre V	— <i>Moraxella. Branhamella</i>	95
Chapitre VI	— <i>Acinetobacter</i>	102
Section III	— Bacilles à Gram positif aérobies	109
Chapitre VII	— <i>Corynebacterium</i>	109
Chapitre VIII	— <i>Listeria</i>	122
Chapitre IX	— <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	131
Chapitre X	— <i>Bacillus</i>	135
Section IV	— Enterobacteriaceae	149
Généralités sur les <i>Enterobacteriaceae</i>		149
Chapitre XI	— <i>Escherichia coli</i>	152
Chapitre XII	— <i>Shigella</i>	160
Chapitre XIII	— <i>Salmonella. Citrobacter</i>	166
Chapitre XIV	— <i>Klebsiella. Enterobacter. Serratia</i>	184
Chapitre XV	— <i>Proteus. Providencia. Morganella</i>	192
Chapitre XVI	— <i>Yersinia</i>	196
Section V	— Autres bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies	205
Chapitre XVII	— Les Vibrions	205
Chapitre XVIII	— <i>Aeromonas. Plesiomonas</i>	224
Chapitre XIX	— <i>Pasteurella</i>	233

Chapitre XX	— <i>Haemophilus</i>	241
Chapitre XXI	— Bacilles à Gram négatif à croissance difficile	254
Section VI	— Bacilles à Gram négatif aérobies stricts	265
Chapitre XXII	— <i>Pseudomonas</i>	265
Chapitre XXIII	— Autres bacilles non fermentants	283
<i>PLANCHES COULEUR</i>		
Chapitre XXIV	— <i>Campylobacter- Helicobacter</i>	289
Chapitre XXV	— <i>Brucella</i>	296
Chapitre XXVI	— <i>Legionella</i>	305
Chapitre XXVII	— <i>Bordetella</i>	314
Chapitre XXVIII	— <i>Francisella</i>	321
Section VII	— Bactéries anaérobies	325
Généralités sur les bactéries anaérobies strictes		325
Chapitre XXIX	— Cocci anaérobies	330
Chapitre XXX	— <i>Clostridium</i>	334
Chapitre XXXI	— Bacilles à Gram négatif anaérobies	371
Chapitre XXXII	— Bactéries des vaginoses	385
Section VIII	— Mycobactéries	389
Généralités sur les Mycobactéries		389
Chapitre XXXIII	— Bacilles de la tuberculose	390
Chapitre XXXIV	— Autres Mycobactéries, dites atypiques	410
Chapitre XXXV	— <i>Mycobacterium leprae</i>	422
Section IX	— Spirochètes	431
Généralités sur les Spirochètes		431
Chapitre XXXVI	— <i>Treponema</i>	433
Chapitre XXXVII	— <i>Leptospira</i>	443
Chapitre XXXVIII	— <i>Borrelia</i>	452
Section X	— Bactéries particulières	463
Chapitre XXXIX	— <i>Mycoplasma. Ureaplasma</i>	463
Chapitre XL	— <i>Rickettsia</i>	473
Chapitre XLI	— <i>Chlamydia</i>	482
Chapitre XLII	— <i>Actinomycetes</i>	490
Bibliographie Générale		501
Annexes		502
Maladies à déclaration obligatoire		502
Liste des centres de référence		505
Index		507

SECTION 1 — COCCI A GRAM POSITIF

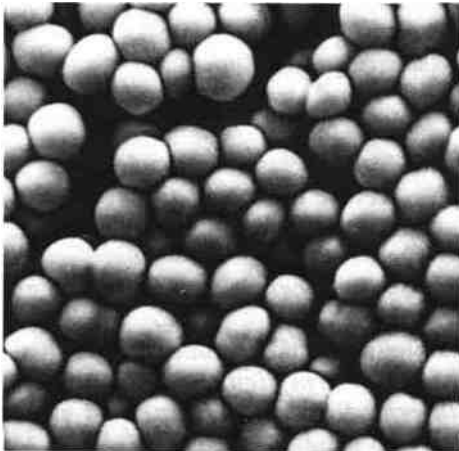
Chapitre 1 LES STAPHYLOCOQUES

HISTORIQUE

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES STAPHYLOCOQUES

A - Position taxonomique et classification



La famille des *Micrococcaceae* est composée de trois genres de cocci à Gram positif en amas qui diffèrent par leur G + C % : *Staphylococcus* (30 - 39 %), *Micrococcus* (65 - 75 %) et *Planococcus* (48 - 52 %). Ce dernier genre n'est rencontré qu'en bactériologie marine.

Les espèces appartenant à ces **trois** genres possèdent une **catalase** et se développent en aérobiose. Les cocci à Gram positif en amas qui se développent uniquement en anaérobiose sont dénommés *Peptococcus* et seront traités avec les bactéries anaérobies.

Le genre *Staphylococcus* occupe une place très importante en pathologie humaine et animale. Le genre *Micrococcus* a un pouvoir pathogène pratiquement nul. Néanmoins des souches de microcoques sont fréquemment isolées en bactériologie médicale. Il s'agit alors de contaminants qu'il faut distinguer des staphylocoques. Les caractères qui permettent de distinguer les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU 1
CARACTÈRES PERMETTANT LA
DIFFÉRENCIATION ENTRE STAPHYLOCOQUES ET MICROCOQUES

Caractères	Staphylocoques	Microcoques
Composition en bases l'ADN G+C (mol %)	30-39	66-75
Présence de résidus glycine dans le pont interpeptidique du peptidoglycane	+	
Acide teichoïque de paroi	+	
Cytochromes c et d	-	+
Arrangement cellulaire	amas, paires	amas, tétrades
Type respiratoire	aéro-anaérobie^a	aérobie strict ^{*f}
Fermentation du glucose	+(-)* -(+) ^c	
Croissance en anaérobiose (thioglycolate)	+(-)	-(+)
Acidification du glycérol	+(-)	-(+)
Lysostaphine (disque 100 µg)	S(R)	R(S)
Lysozyme (disque 50 µg)	R	S
Oxydase (cytochrome c)	-(+) ^d	+
Nitrofurantoïne (disque 300 µg)	S(>15mm)	R(≤15mm)
Bacitracine (disque 0,02 U)	R	S(10-25mm)
Composé 0/129 (disque 0,5 mg)	R (6-10mm)	S(20-36mm)

-() espèces ou souches présentant un caractère différent

a : *S. hominis* est aérobie strict et *S. saccharolyticus* anaérobie strict

b ; *Micrococcus kristinae* et *M. varians* peuvent croître en anaérobiose

c : *M. kristinae*, *M. varians* peuvent fermenter le glucose

d : *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. caseolyticus* ont une cytochrome c oxydase

Au sein du genre *Staphylococcus*, on distingue d'après la classification de Kloos et Schleifer plus de 20 espèces. Un certain nombre d'entre elles sont trouvées chez l'homme, d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers...). Parmi les espèces retrouvées chez l'homme :

- trois espèces occupent une place privilégiée : *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*,
- les autres, plus rarement impliquées en pathologie humaine, sont : *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. saccharolyticus*, *S. auricularis*, *S. simulons*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*.

Il est classique d'opposer *S. aureus* qui produit une coagulase et est souvent pathogène, aux autres staphylocoques, non producteurs de coagulase et plus rarement responsables d'infections.

B - Habitat et épidémiologie

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les staphylocoques, en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, font partie de la flore normale

de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'auto-infections ou contaminer d'autres individus.

On peut estimer que 20 à 75 % des sujets sont porteurs de *S. aureus* : porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires ; à l'opposé, certains individus sont « non porteurs ».

Les staphylocoques peuvent être trouvés particulièrement dans les fosses nasales antérieures (*S. aureus* : 30 - 40 %, *S. epidermidis* 30 - 100 %). On peut également les isoler de la peau (*S. epidermidis* 85 - 100 %) et surtout des zones chaudes et humides de celle-ci (creux axillaire, périnée) où l'on peut également trouver *S. aureus*. n'est pas rare d'isoler *S. aureus* des selles.

La transmission est surtout interhumaine directe (contact, dissémination manuportée, à partir du nez notamment) ou indirecte par l'intermédiaire des aliments ou du milieu extérieur.

Le nouveau-né est rapidement colonisé par *S. aureus* après l'accouchement et, plus tard, l'enfant peut être contaminé au sein d'une collectivité ; la contamination interhumaine est très variable, certains individus étant de « dangereux disséminateurs », alors que d'autres sujets ne transmettent pratiquement jamais leurs souches.

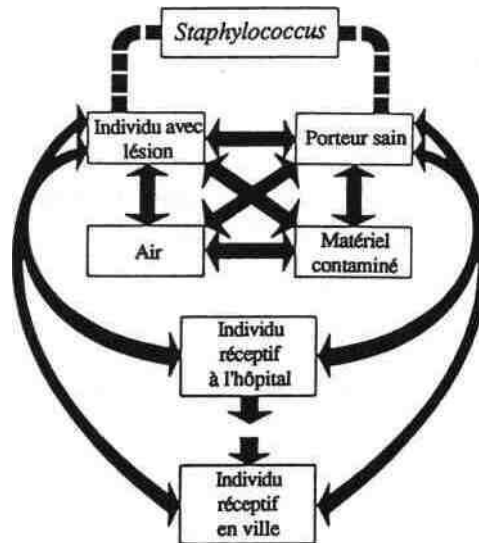


SCHÉMA I
VOIES DE TRANSMISSION DES STAPHYLOCOQUES

II - STAPHYLOCOCCUS AUREUS

A - Pouvoir pathogène

J. Pouvoir pathogène naturel

Les infections à *S. aureus* sont très fréquentes et apparaissent sous des aspects cliniques très variés.

al Les staphylococcies cutanées, sous-cutanées et muqueuses

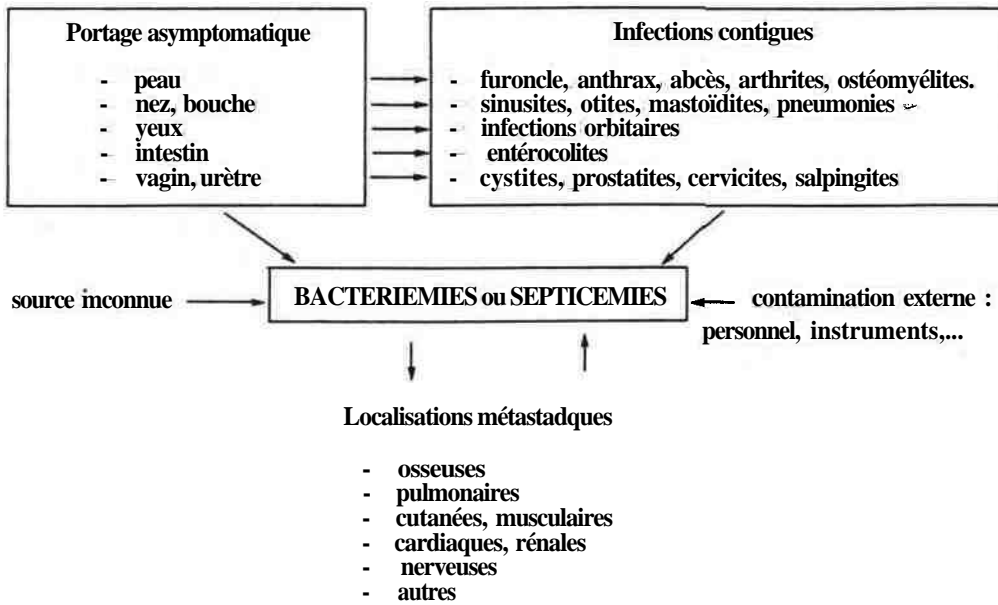
- *S. aureus* peut être à l'origine d'infections cutanées superficielles ou profondes.
L'infection superficielle se traduit par un impétigo, un onyxis ou une folliculite.
L'infection profonde est représentée par des abcès intrafolliculaires de toute la gaine du poil appelés furoncles, ou par des infections des canaux des glandes sudoripares appelées hidrosadénites. L'anthrax est un conglomérat de furoncles et la staphylococcie maligne de la face en est une localisation particulièrement grave. Furonculose et hidrosadénite peuvent être récidivantes. Ces récidives sont parfois liées à des facteurs déclenchants : diabète, surmenage...
- On observe aussi des infections cutanées associées à la présence de cathéters ainsi que des psoriasis ou des eczémas surinfectés par *S. aureus*, mais sans signes cliniques d'infection.
- Des rashes scarlatiniformes font partie du syndrome de choc toxique lié à la présence de souches productrices de la toxine du syndrome de choc toxique ou de certaines entérotoxines. Des rashes sont aussi liés à la présence de toxine pyrogène.
- Le syndrome de Lyell staphylococcique ou Maladie de Ritter von Rittershain ou syndrome des enfants ébouillantés est lié à la sécrétion d'une toxine staphylococcique, l'exfoliatine ou épidermolysine, qui provoque la desquamation de la couche superficielle de l'épidermie.
- Au niveau des muqueuses, *S. aureus* peut être impliqué dans des phlegmons de l'amygdale, des sinusites ou des otites parfois récidivantes.

bl Localisations viscérales à S. aureus

- Elles surviennent soit isolément, soit dans le cadre d'une septicémie patente :
- *staphylococcies osseuses* : l'ostéomyélite aiguë est une affection de l'enfant ou de l'adolescent : elle touche classiquement les os longs et peut devenir chronique . Les infections osseuses staphylococciques post-chirurgicales sont très préoccupantes.
 - *staphylococcies pleuropulmonaires* : les formes du nourrisson sont très fréquentes et graves. Les formes de l'adulte sont plus rares et peuvent apparaître après une virose telle la grippe.
 - *staphylococcies urogénitales* : les pyélonéphrites à staphylocoques sont assez fréquentes ; *S. aureus* peut aussi entraîner la formation d'abcès isolés du rein ou des phlegmons périnéphrétiques.
 - *staphylococcies neuroméningées* : elles sont rares et dominées par les méningites observées surtout en milieu neuro-chirurgical (valves). *S. epidermidis* est alors souvent isolé. Les méningites ne doivent pas être confondues avec l'épidurite staphylococcique, le pus étant alors localisé dans l'espace péri-dural. Des abcès du cerveau peuvent être rencontrés.
 - *l'endocardite staphylococcique* s'observe notamment chez les patients porteurs de valves cardiaques artificielles. Chez les drogués, ce sont souvent des endocardites du cœur droit.

cl Septicémies à S. aureus

Les staphylococcémies sont causées et entretenues par un foyer infectieux primaire compliqué de thrombophlébite ; ce sont des infections fréquentes, d'une gravité préoccupante. L'évolution est émaillée de métastases septiques.



SCHEMA 2
LES PRINCIPALES INFECTIONS STAPHYLOCOCCIQUES

dl Toxi-infections alimentaires

- Elles sont dues à l'ingestion d'entérotoxines (A et E), préformées dans l'aliment, résistant aux sucs digestifs et pour certaines à la chaleur, entraînant des troubles d'apparition précoce (moins de 3 heures) avec vomissements, diarrhée, déshydratation et absence de fièvre.
- L'évolution est bénigne, sauf en cas de pertes hydro-électrolytiques importantes (sujets âgés, nourrissons).
- Le staphylocoque doit être recherché dans l'aliment.
- La recherche de l'entérotoxine contenue dans les aliments ou produite par la souche isolée est possible dans des laboratoires spécialisés.

et Entérocolites aiguës

- Elles surviennent au décours d'une antibiothérapie et sont dues à la prolifération de *S. aureus* antibiorésistant et producteur d'entérotoxine.
- Ces staphylocoques doivent être recherchés dans les selles.
- Les laboratoires spécialisés peuvent déceler si les staphylocoques isolés sont producteurs ou non d'entérotoxine.

// *Syndrome de choc toxique (TSS)*

Il associe fièvre, hypotension, rash maculaire érythémateux suivi d'une desquamation scarlatiniforme et souvent de diarrhée. Les hémocultures sont stériles.

Il est lié à l'action de la toxine staphylococcique, TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1), ou, semble-t-il, de certains sérotypes d'entérotoxine.

Ce syndrome a été décrit en 1978 aux ILS.A. comme la conséquence d'une prolifération vaginale de *S. aureus* chez des femmes utilisant des tampons périodiques. Des souches responsables de TSS peuvent être également isolées de lésions diverses.

La grande fréquence des TSS aux U.S.A. entre 1978 et 1982 n'a pas été observée en Europe.

2. Pouvoir pathogène expérimental

Il est nécessaire d'injecter 5.10^6 UFC de *S. aureus* sous la peau pour produire une infection en peau saine chez l'homme ; par contre 100 bactéries suffisent sur une zone de suture ou sur une peau comportant des lésions préexistantes.

Aucun animal de laboratoire n'est capable de reproduire les différents aspects de la maladie humaine. Cependant le lapin est l'animal le plus sensible : l'injection sous-cutanée de *S. aureus* produit un abcès qui guérit spontanément et l'injection intraveineuse conduit à la mort en 4 à 10 jours avec des abcès viscéraux (reins surtout).

B - Physiopathologie

S. aureus peut devenir pathogène à la suite de diverses circonstances :

- pénétration du germe dans l'organisme, le plus souvent après rupture de la barrière cutanée (blessures, interventions chirurgicales, brûlures, dermatoses, injections, cathéters,...) ou au niveau d'un follicule pileux.
- rupture de l'équilibre hôte-bactérie à la suite de circonstances favorisant l'infection : virose (grippe, rougeole), antibiothérapie sélectionnant une souche de *S.aureus*, déficits immunitaires, diabète, alcoolisme...

Il s'ensuit une multiplication bactérienne avec production d'enzymes et de toxines correspondant à l'expression de la virulence du germe. Ceci explique l'extension de l'infection qui peut aboutir à une septicémie. Schématiquement, plusieurs étapes peuvent se succéder dans lesquelles sont impliquées diverses substances d'origine staphylococcique :

- envahissement local : hyaluronidase, exfoliatine,
- nécrose cellulaire : protéases, lipases, estérases, DNases, phosphatases, toxine alpha (et bêta, gamma, delta),
- diminution des défenses locales : leucocidine, capsule, protéine A,
- foyer de thrombophlébite régionale : coagulase,
- embols septiques : fibrinolyse.

En raison de ses nombreuses toxines et enzymes, *S. aureus* détruit les cellules de l'organisme et produit du pus. Il est ainsi le type même du germe pyogène.

C - Substances excrétées par *S. aureus*

Elles sont particulièrement nombreuses chez *S. aureus*.

Les déterminants génétiques sont connus pour la plupart de ces substances (Tableau II).

I. Toxines de *S. aureus*

- **les hémolysines** : leurs principales propriétés sont regroupées dans le tableau III :
 - l'alpha-hémolysine ou alpha-toxine staphylococcique est de nature protéique, thermostable, antigénique, induisant la formation d'anticorps neutralisants. Elle est cytotoxique et cytolytique pour une grande variété de types cellulaires. Elle semble s'insérer dans la membrane cytoplasmique des cellules-cibles et permet le passage de molécules de petite taille.
 - la bêta-hémolysine est thermolabile. Elle agit comme une sphingomyélinase de type C et donne une hémolyse accrue en présence de souches de *Streptococcus agalactiae* : c'est le CAMP-test (du nom de leurs découvreurs : Christie, Atkins, Munsch-Petersen)
 - la gamma-hémolysine comporte deux facteurs 1 et II agissant en synergie.

TABLEAU n
 DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES DE QUELQUES PROTÉINES
 EXTRACELLULAIRES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Enzyme ou toxine	Chromosome	Plasmide	Gène clone
Bêta-lactamase	+	+	+
Coagulase	+		+
Exfoliadne A	+		+
Exfoliadne B		+	+
Entérotoxine A	+		+
Entérotoxine B		+	+
Entérotoxine C		+	+
Entérotoxine D		+	+
Entérotoxine E	+		+
Hémolysine alpha	+		+
Hémolysine bêta	+		
Hémolysine gamma	+		+
Hémolysine delta	+		+
Lipase	+		
Pigment	+		
Staphylokinase	+		+
Staphylococcine		+	
Protéine A	+		+
TSST-1 (toxine du choc toxique)	+		+

TABLEAU m
 PROPRIÉTÉS DES HÉMOLYSINES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

		α	β	γ	δ
Lyse des hémades de	mouton	+++	+++	+++	++
	lapin	+++	+	+++	++
	cheval				+++
	homme	±	+	+++	+++
	létale	+++	±	±	+
Action	dermoné-cronque	+	-	-	+
	lyrique sur leucocytes	+	-	+	+
Andgénéicité		+	+	+	±

Ceux-ci sont antigéniques et le cholestérol inhibe leur action. Le mode d'action moléculaire de cette toxine reste inconnu.

- la delta-hémolysine contient des acides aminés hydrophobes et hydrophiles et agit comme un détergent sur les membranes.

la leucocidine de Panton Valentine détruit très spécifiquement les polynucléaires et les macrophages de l'homme et du lapin. La leucocidine

purifiée, provoque une dermonécrose chez le lapin. L'effet toxique sur les leucocytes serait dû à une modification de la perméabilité cationique. **On** distingue 2 constituants F et S agissant en synergie.

- **les entérotoxines** : elles sont responsables d'intoxications alimentaires et sont caractérisées par leur masse moléculaire comprise entre 27 800 et 34 100 daltons, leur point iso-électrique et leur sérotypie.

Elles sont au nombre de 7 : A, B, C₁, C₂, C₃, D et E.

Les sérotypes A, B et D sont les plus fréquents dans les intoxications alimentaires.

Certaines de ces entérotoxines ont un effet mitogène sur les lymphocytes T. Certaines (*Ent B*) sont des protéines plus thermostables que les autres. Elles résistent aux enzymes protéolytiques.

La dose minimale toxique se situe aux environs de 1 (lg pour 100 g d'aliments. La détection des toxines dans les aliments, les matières fécales ou les bouillons de culture s'effectue par une technique immunologique'(immunodiffusion, agglutination, radio-immunologie, ELISA).

La possession d'un gène d'entérotoxine n'est pas exceptionnelle. On retrouve une ou plusieurs de ces toxines chez environ la moitié des souches hospitalières, ce qui rend délicat le rattachement d'un syndrome clinique à l'isolement d'une souche entérotoxino-gène.

- **les toxines épidermolytiques** (ou exfoliatines) sont produites par certaines souches de *S. aureus* (5 %).

Ce sont des protéines d'un poids moléculaire de 27 000 daltons et antigéniques ; 30 à 40 % des souches du groupe phagique II produisent ces toxines, soit 5 % des souches hospitalières.

On distingue 2 sérotypes A et B : le gène codant le sérotype A est chromosomique (90 % des exfoliatines) et celui codant le sérotype B est plasmidique (4 à 5 % des exfoliatines). Les 2 sérotypes peuvent être produits par une même souche.

Ces toxines (A ou B) entraînent un clivage intra-épidermique. Le mode d'action au niveau moléculaire reste inconnu. Ces toxines peuvent être mises en évidence sur le souriceau nouveau-né, par contre-immunoelectrophorèse ou ELISA. Les souches toxino-gènes sont particulièrement responsables d'infections néonatales et infantiles : syndrome de Lyell, impétigo bulleux staphylococcique...

- **les toxines pyrogènes**. Il existe deux toxines pyrogènes, mitogènes, aspécifiques et antigéniques d'un poids moléculaire de 12000 daltons réparties en deux sérotypes A et B. L'effet pyrogène est observé sur le lapin. Ces toxines sont impliquées dans les fièvres scarlatiniformes staphylococciques.
- **toxine du syndrome de choc toxique** (TSST). Au cours de ce syndrome on observe notamment un rash érythémateux avec ou sans desquamation. Les staphylocoques responsables produisent une toxine (TSST-1) sensible aux enzymes protéolytiques, antigénique et d'une masse moléculaire de 20 000 daltons ; ce syndrome a également été associé à la production d'entérotoxines ; cette toxine est produite par 90 % des souches isolées dans les syndromes de choc toxique et par 11 % des souches hospitalières tout-venant.
- "Succinic oxidase factor". Cette toxine inhibe l'oxydation du succinate par les mitochondries isolées du foie de souris.

2. Enzymes de *S. aureus*

Ces enzymes ont un intérêt pathogénique et/ou diagnostique **important**.

al Coagulase libre

S. aureus est capable d'excréter une protéine provoquant la coagulation du plasma humain ou de lapin (prélevé sur citrate, oxalate, héparine ou EDTA) et appelée « coagulase libre ». Un staphylocoque produisant cette toxine sera identifié comme *S. aureus*. Mais 2 espèces observées en pratique vétérinaire peuvent produire cette enzyme : *S. intermedius* et *S. hyicus*.

La formation du coagulum ne nécessite pas la présence de calcium, elle n'est pas activée par le fibrinogène purifié, mais a besoin d'une globuline voisine de la prothrombine (coagulase-reacting-factor). Cette coagulase est antigénique (7 groupes antigéniques) et entraîne l'apparition d'anticorps inhibant l'activité biologique.

Elle joue un rôle dans la formation de thrombophlébites suppurées et inhiberait la phagocytose.

Au laboratoire, la détection de la coagulase s'effectue en mettant en présence du plasma de lapin et la souche à étudier dans un tube à 37°C ; la prise en masse du mélange est réalisée en 3 à 6 ou parfois en 24 heures ; la coagulation peut être suivie d'une dissolution du caillot par suite de l'action de la staphylokinase.

bl Coagulase liée ou dumping factor ou facteur d'affinité pour le fibrinogène

A côté de cette coagulase « libre », on reconnaît une coagulase insoluble, « liée » à la surface des germes et également appelée dumping factor. Elle se lie au fibrinogène et est responsable de l'agrégation sur lame des staphylocoques en présence de sérum ; ce facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être mis en évidence par contact de la souche à étudier avec des hématies de mouton ou des particules de latex recouvertes de fibrinogène ; une agglutination apparaissant en quelques secondes est trouvée chez 98 % des souches de *S. aureus*. Ce dumping factor ne dégrade pas le fibrinogène en fibrine. Cependant, ce test peut être positif pour certaines espèces de staphylocoques coagulase négatifs, telles *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*.

cl Fibrinolysine ou staphylokinase

Cette enzyme est un activateur du plasminogène (action semblable à celle de la streptokinase), agissant sur le plasma humain et de lapin. Cette activité est mise en évidence sur des plaques de gélose contenant de la fibrine (zone d'éclaircissement). Cette substance thermolabile est antigénique. Elle dissout les caillots et pourrait jouer un rôle dans la formation d'embols septiques.

dl Hyaluronidase

Cette enzyme thermolabile hydrolyse l'acide hyaluronique, elle fluidifie la substance fondamentale du tissu conjonctif peut être recherchée par viscosimétrie.

el Nucléase

La nucléase (DNase) de *S. aureus* (ou thermonucléase) est thermostable, alors que celle des autres espèces bactériennes est thermolabile. L'activité enzymatique est mise en évidence sur milieu à base d'ADN avec du bleu de toluidine (halo rosé) ; la réaction peut être rendue plus spécifique par séro-inhibition de la nucléase de *S. aureus*, recherche qui peut être pratiquée en 4 heures.

// Autres activités enzymatiques

Des activités lipasiques, estérasiques, protéasiques peuvent être mises en évidence (milieu à l'oeuf de Baird-Parker), de même qu'une activité phosphatasique ; ainsi il existe 2 phosphatasases (acide et alcaline) qu'il est facile de rechercher.

D - Structure et antigènes

Plusieurs substances de la paroi des staphylocoques jouent un rôle dans les réactions immunologiques.

1. Le peptidoglycane

Staphylocoques et microcoques possèdent des peptidoglycanes qui diffèrent entre eux par leurs acides aminés. La structure du peptidoglycane de *S. aureus* est bien connue : le diaminoacide présent est la L-lysine.

Les staphylocoques sont lysés par une endopeptidase, la lysostaphine, qui clive la liaison glycyl-glycine présente dans le pont interpeptidique, mais ils résistent généralement à l'action muramidase du lysozyme.

2. Les acides teichoïques

La paroi des staphylocoques comporte des polyolphosphates (polyribitol ou polyglycérol-phosphate) substitués par des hexoses.

	polyol	substituant
<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	ribitol glycerol	N-acétylglucosamine ou glucose

Les microcoques contiennent des acides teichoïques sans ribitol ou glycerol.

Les acides teichoïques de *S. aureus* sont aussi appelés polysaccharide pA. Dans certaines conditions les acides teichoïques peuvent être remplacés par des acides teichuroniques (N-acétyl D-fucosamine, acide N-acétyl D-mannosaminuronique en polymères chez *S. aureus*). Les acides teichoïques jouent un grand rôle sur les interactions entre bactéries et cellules et sur fixation des bactériophages ; de plus ils sont antigéniques. Ils sont liés de façon covalente aux chaînes de peptidoglycane.

3. Polysaccharides de surface

Ces antigènes de surface ont été décrits chez des souches capsulées. Cette capsule peut se former de façon plus abondante lors de la croissance de *S. aureus* en présence de sérum dans un milieu faiblement gélose. Ces antigènes sont aussi décelables sur bon nombre de souches dites non capsulées, mais porteuses de polysaccharides identiques en moindre quantité. Certains de ces polysaccharides empêchent l'activation de la voie alterne du complément et protègent ainsi la bactérie de la phagocytose et de l'action bactéricide du sérum. Une classification de ces polysaccharides en 8 types capsulaires a été proposée et deux types, 5 et 8, recouvrent 70-80 % des souches responsables de septicémies ; ces travaux peuvent déboucher sur la détection d'antigènes solubles staphylococciques.

4. Protéine A

Il s'agit d'une protéine (PM 42 kDa) antigénique, insoluble à l'état natif et constitutive de la paroi de *S. aureus*. Elle fixe (schéma 3) la fraction Fc des immunoglobulines humaines IgG1, 2 et 4, laissant la partie Fab libre. *In vitro*, on peut ainsi aisément fixer à la surface de *S. aureus* des immunoglobulines (par ex. anti-méningocoque ou anti-pneumocoque) pour détecter les antigènes correspondants dans les cultures ou les produits pathologiques ; il s'agit de la coagglutination. N.B. : la fixation des IgG sur la protéine A est fonction de l'espèce animale d'où proviennent les IgG et aussi des sous-classes d'IgG considérées : par exemple, les IgG de mouton ou de chèvre se fixent peu sur la protéine A.

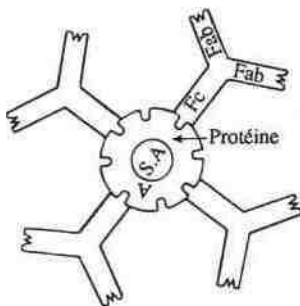


SCHÉMA 3
S. AUREUS SENSIBILISÉ AVEC UNE IMMUNOGLOBULINE

5. Antigènes de type et sérotypie.

Toutes les souches de *S. aureus* possèdent des facteurs antigéniques de surface utilisés dans des classifications. Il existe près de 30 facteurs antigéniques et deux classifications principales.

Dans le système de Pillet, 13 sérums sont utilisés ; les sérotypes les plus fréquents sont les I, II, III et 18 ; en France 10 % des souches sont non typables dans ce système. Le système d'Oeding permet une meilleure approche de la structure antigénique (mosaïque) des souches, mais est de réalisation technique plus difficile ; les antigènes sont désignés par les sigles a4, a5, b1, c1, h1...

6. La lysotypie

Cette méthode est utilisée pour comparer les souches de *S. aureus* isolées au cours d'épidémies hospitalières. Elle consiste à soumettre la souche à tester à une série de 23 bactériophages. La lyse de la souche par un bactériophage est conditionnée par l'existence au niveau de la paroi d'un récepteur spécifique pour ce phage. Certaines combinaisons lytiques ont lieu plus fréquemment que d'autres, ce qui a permis de définir des groupes phagiques : groupes I, II, III, IV (non observé chez l'homme) et V.

Les groupes 1 et III sont les plus fréquents chez l'homme.

E - Diagnostic bactériologique d'une infection à *S. aureus*

1. Les prélèvements

Ils doivent être effectués avant toute antibiothérapie et pratiqués avec une asepsie rigoureuse : non seulement pour les hémocultures, les LCR, les urines, mais aussi

pour les pus, les biopsies, les aspirations bronchiques, les écouvillonnages. Il faut éviter la contamination du produit pathologique par des souches de *Staphylococcus aureus* et de *S. epidermidis* souvent présentes sur la peau. La répétition des hémocultures permet de trancher en faveur d'une septicémie ou de souillures.

Les bactériologistes peuvent aussi être amenés à rechercher et à dénombrer les staphylocoques dans les aliments, les eaux, ou dans l'air en milieu hospitalier.

2. Examen direct

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif, de 0,8 à 1 u.m de diamètre, disposés en amas, en diplocoques, en courtes chaînettes, voire en grappes typiques. Ils sont immobiles, asporulés, parfois capsulés.

L'observation de cocci à Gram positif en courtes chaînettes ou en amas dans un pus permet souvent d'évoquer un staphylocoque.

3. Caractères cultureux

S. aureus croît abondamment sur milieu gélose (colonies de 1 à 2 mm de diamètre) ; certaines souches produisent un pigment jaune-orange, mais cette production est irrégulière.

La culture est obtenue en 18 à 24 heures à 37°C (culture possible de 10 à 45°C) sur milieux ordinaires. *S. aureus* pousse en présence de fortes concentrations salines (milieu sélectif de Chapman à 7,5 % de NaCl). Le pH optimal est de 7,0 à 7,5.

Il existe, des variants exigeants en facteurs de croissance : thiamine, acide panthoténique...

Pour les produits monomicrobiens, l'isolement est facile en bouillon, ou en milieu solide non sélectif (trypticase-soja, Mueller-Hinton, gélose au sang).

Pour les produits pathologiques polymicrobiens ou les aliments, on doit recourir à des milieux sélectifs comme le milieu de Chapman (milieu hypersalé + mannitol) ou milieu de Baird-Parker au tellurite (utilisé surtout en microbiologie alimentaire).

4. Type respiratoire

S. aureus est un germe aérobie-anaérobie facultatif. Quelques souches exigent du CO₂ pour croître. Toutes les souches produisent une catalase.

5. Identification

En 18 à 24 heures sur milieu gélose riche, on observe des colonies de 1 à 2 mm de diamètre produisant parfois un pigment jaune et constituées de cocci à Gram (+) en amas, catalase (+).

Sur milieu de Chapman, *S. aureus* provoque une acidification (virage au jaune) du mannitol ; sur milieu de Baird-Parker, *S. aureus* forme des colonies noires (réduction du tellurite) avec un halo clair (protéolyse) et, plus tardivement, une opacification dans le halo (lipase).

Sur les colonies suspectes, on recherchera la classique coagulase ou une inhibition de la nucléase thermostable à l'aide d'anticorps. Des tests de dépistage rapide existent également (recherche du facteur d'affinité pour le fibrinogène et recherche de protéine A). Mais il existe quelques faux positifs et faux négatifs avec ces tests.

S'il s'agit de l'espèce *S. aureus*, l'identification est parfois complétée dans une perspective épidémiologique par des galeries plus poussées, par la sérotypie ou par la lysotypie.

À noter :

- que l'isolement de certaines souches de *S. aureus*, à partir d'hémocultures notamment, peut parfois être difficile (endocardite, suppurations chroniques),

car certaines souches donnent des microcolonies d'apparition lente dont la croissance peut être améliorée par l'addition de facteurs de croissance.

- que la recherche de toxines : entérotoxines, exfoliatine est réservée à ce jour à des laboratoires spécialisés, mais que des recherches d'entérotoxines par des techniques d'agglutination passive de particules de latex ou par ELISA, directement dans les produits sont maintenant utilisées, notamment en bactériologie alimentaire.
- que le terme de staphylocoque pathogène (tout comme celui de staphylocoque doré) doit être proscrit : *S. aureus* isolé de la peau ou des muqueuses (portage) n'est pas pathogène, alors que *S. epidermidis* peut, dans certaines circonstances, être pathogène.

6. Diagnostic différentiel

- *Micrococcus*. Ce germe est séparé des staphylocoques par son type respiratoire, par son incapacité à oxyder le glycérol (1 %) en présence d'érythromycine (0,4 (ig/ml) et par sa résistance à 200 u.g/ml de lysostaphine (voir Tableau I).
- Autres espèces de staphylocoques : il faut noter que certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Chez d'autres souches de *S. aureus*, le facteur d'affinité pour le fibrinogène peut être masqué par la présence d'une capsule polysaccharidique.

Des espèces de staphylocoques autres que *S. aureus* peuvent être pigmentées particulièrement à la primoculture : *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*...

D'autres espèces peuvent aussi être hémolytiques (*S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi*...)

Enfin des espèces autres que *S. aureus* peuvent pousser sur milieu de Chapman et acidifier le mannitol (*S. cohnii*, *S. saprophyticus*,...).

- *Stomatococcus*. Ce germe, catalase négative ou faible, ne croît pas sur milieu hypersalé, n'est pas hémolytique et ses colonies de consistance élastique adhèrent à la gélose.

7. Diagnostic rapide

Il n'existe pas actuellement de diagnostic rapide et fiable d'infection à *S. aureus* par recherche d'antigènes solubles. Les meilleurs antigènes candidats pour ce type de dépistage seraient représentés par les polysaccharides de surface des staphylocoques.

8. Diagnostic indirect

Il a actuellement peu de valeur pratique.

Le titrage des antistaphylolysines alpha peut présenter un intérêt dans des infections profondes ou chroniques (osseuses notamment), le taux normal étant inférieur ou égal à 2 UI par ml. La valeur de cette réaction sérologique est actuellement contestée.

La recherche d'anticorps anti-acides teichoïques ou anti-peptidoglycane par contre-immuno- électrophorèse ou diffusion en gel peut avoir des indications en cas d'endocardites ou de complications métastatiques à hémocultures négatives ou de foyers infectieux inaccessibles à la culture, mais on ne dispose pas à ce jour d'antigène bien standardisé.

III - STAPHYLOCOQUES COAGULASE NÉGATIFS

A - Identification

Les staphylocoques coagulase négatifs ne sont identifiés complètement que lorsque les circonstances de leur isolement indiquent qu'ils sont potentiellement en situation de jouer un rôle de pathogène. Les tableaux IV et V indiquent les caractères bactériologiques qui permettent de faire le diagnostic d'espèce.

TABLEAU IV
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES PRINCIPALES ESPÈCES DE
STAPHYLOCOQUES AYANT UN RÔLE POTENTIELLEMENT PATHOGÈNE

Caractère	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Coagulase	+	-	-
DNase thermostable	+		
Résistance à la novobiocine (disques 5 µg)			+a
Nitrate-réductase	+	+	
Phosphatase	+	+	
D-mannitol (acidification)	+		±

(a) Diamètre de la zone d'inhibition < 16 mm

A propos de la croissance en anaérobiose, de l'hémolyse et du test à la novobiocine, trois remarques doivent être faites.

1. *Étude de la croissance en anaérobiose* (inoculation par 0,5 ml de bouillon à 0,5 unité Me Farland).

S. hominis ne pousse quasiment qu'en aérobiose (bouillon thioglycolate).

S. saccharolyticus ne pousse qu'en anaérobiose.

5. *haemolyticus* et *S. capitis* croissent beaucoup **mieux en** aérobiose qu'en anaérobiose.

2. *Étude de la vitesse d'apparition de l'hémolyse*

L'hémolyse de *S. haemolyticus* est tardive (après plus de 24 heures d'étuve **souvent**).

3. *Test à la novobiocine*

S. saprophyticus est résistant à cet antibiotique. Ce test est utile sur des souches isolées d'urines. Mais d'autres staphylocoques peuvent résister aussi à la novobiocine (*S. cohnii*, *S. xylosus*).

En pratique, *S. hominis*, *S. haemolyticus* et *S. simulons* représentent 5 à 20 % des staphylocoques coagulase-négatifs isolés chez l'homme.

B - Signification clinique des staphylocoques **coagulase-négatifs**

Certaines espèces (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. saccharolyticus*, *S. capitis* et *S. auricularis*) sont trouvées de façon constante sur la peau ou les muqueuses des orifices naturels.

Les autres espèces y sont rencontrées de façon inconstante et la densité de ces populations bactériennes est souvent faible. Il existe une adaptation écologique de *S. capitis* au cuir chevelu et de *S. auricularis* au conduit auditif externe.

TABLEAU V
TABLEAU D'IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES
 (Galerie API-STAPH de API-SYSTEM)

Pourcentages de réactions positives après 24 h à 35-37°C

Galerie API-STAPH	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL
Staph. aureus	0	100	100	99	93	90	96	85	1	1
Staph. epidermidis	0	100	100	60	89	74	2	1	O	1
Staph. saprophyticus	0	100	100	2	99	99	94	99	1	1
Staph. cohnii	0	100	100	17	75	0	92	92	33	0
Staph. xylosus 1	0	100	100	99	27	5	72	88	1	1
Staph. xylosus 2	0	100	100	89	88	98	98	96	26	48
Staph. haemolydcus 1	0	100	1	1	99	88	95	50	1	0
Staph. haemolydcus 2	0	100	1	1	99	88	95	50	1	0
Staph. hominis 1	0	100	100	1	99	19	99	25	0	0
Staph. hominis 2	0	100	100	70	99	19	99	1	O	O
Staph. wameri	0	100	100	50	99	5	100	60	0	0
Staph. capitis	0	100	100	94	13	7	2	30	0	0
Staph. simulans	0	100	100	85	1	99	99	99	0	0
Staph. hyicus*	0	100	100	99	1	95	80	1	O	O
Staph. sciuri*	0	100	100	40	72	9	90	100	0	2
Staph. lentus	0	100	100	99	67	78	90	100	0	99
Micrococcus spp	0	11	16	4	4	0	0	0	0	0
Micrococcus varians	0	100	81	18	0	54	22	O	O	O

Galerie API-STAPH	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
Staph. aureus	99	98	99	0	0	96	1	98	71	54
Staph. epidermidis	56	92	75	1	0	100	11	29	51	75
Staph. saprophyticus	3	8	95	0	0	100	1	54	4	95
Staph. cohnii	0	33	99	33	O	1	1	1	1	1
Staph. xylosus 1	77	22	94	1	99	99	5	5	5	11
Staph. xylosus 2	87	89	75	21	99	99	1	93	6	90
Staph. haemolydcus 1	93	50	60	0	0	99	45	96	94	10
Staph. haemolydcus 2	98	40	6	0	0	99	1	5	10	90
Staph. hominis 1	99	50	90	0	0	100	3	5	92	96
Staph. hominis 2	95	5	35	0	0	100	80	95	5	80
Staph. wameri	17	12	99	0	0	100	1	1	93	94
Staph. capitis	99	1	93	0	0	20	1	1	60	15
Staph. simulans	99	1	65	0	0	99	1	99	85	85
Staph. hyicus*	50	99	85	0	0	100	1	85	99	60
Staph. sciuri*	100	25	0	1	1	100	1	99	1	1
Staph. lentus	100	75	0	89	33	100	1	99	1	1
Micrococcus spp	31	36	36	0	4	4	0	0	4	18
Micrococcus varians	100	11	45	0	0	0	0	0	0	93

Galerie API-STAPH	LSTR
Staph. aureus	0
Staph. epidermidis	0
Staph. saprophyticus	0
Staph. cohnii	0
Staph. xylosus 1	0
Staph. xylosus 2	0
Staph. haemolydcus 1	0
Staph. haemolydcus 2	0
Staph. hominis 1	0
Staph. hominis 2	0
Staph. wameri	0
Staph. capitis	0
Staph. simulans	0
Staph. hyicus*	0
Staph. sciuri*	0
Staph. lentus	0
Micrococcus spp	100
Micrococcus varians	100

* Souches d'origine vétérinaire

0 à 10 % réactions positives

20 à 79 % réactions variables

80 à 100 % réactions positives

0 : Témoin négatif ; Acidification = GLU, glucose ;
 FRU, fructose ; MNE, mannose ; MAL, maltose ;
 LAC, lactose ; TRE, tréhalose ; MAN, mannitol ;
 XLT, xylitol ; MEL, mélibiose ; RAF, raffinose ;
 XYL, xylose ; SAC, saccharose ; MDG, méthyl-
 D-glucoside ; NAG, N-acetyl-glucosamine ; NIT,
 Nitrate-reductase ; PAL, a-naphtyl-phosphate ; VP,
 Voges-Proskauer ; ADH, Arginine dihydrolyse ;
 URE, uréase. LSTR. Résistance à la Ivsostanhipin.

Les staphylocoques coagulase négatifs ont longtemps été considérés comme dépourvus de pouvoir pathogène et comme de simples contaminants de prélèvements défectueux. Aujourd'hui il est clair qu'au moins deux espèces, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, sont des bactéries opportunistes potentiellement pathogènes. Les principales infections dues à des staphylocoques coagulase négatifs, ainsi que leur place en pathologie sont indiquées dans les tableaux VI et VII

TABLEAU VI
PRINCIPALES INFECTIONS
DUES AUX STAPHYLOCOQUES COAGULASE NEGATIFS

- Infections sur matériel étranger :
 - cathéters intravasculaires
 - shunts et greffes d'hémodialyse
 - shunts de dérivation du LCR
 - cathéters de dialyse péritonéale
 - prothèses valvulaires cardiaques
 - prothèses vasculaires
 - prothèses articulaires
 - sondes et électrodes de pacemaker
- Endophtalmie après chirurgie oculaire
- Endocardites sur valve native
- Ostéomyélite
- Inféodons urinaires
- Infections chez les sujets immunodéprimés

TABLEAU VII
ROLE DES STAPHYLOCOQUES COAGULASE NEGATIFS (SCN)
DANS LES INFECTIONS SUR MATERIEL ETRANGER

Matériel implanté	Fréquence des SCN parmi les agents infectieux responsables
Cathéter veineux	30 - 55 %
Prothèse valvulaire	11 - 27 %
Prothèse vasculaire	12 - 20 %
Shunt dérivation LCR	30%
Prothèse hanche	12 - 15 %
Cathéter dialyse péritonéale	20 - 40 %

1. *S. epidermidis*

Il peut être responsable d'infections de prothèses vasculaires ou articulaires, de valves cardiaques, de valves de dérivations du LCR. Il est également impliqué dans la survenue de péritonites consécutives à des dialyses péritonéales, d'endocardites subaiguës chez les drogués, d'endophtalmies et d'infections diverses particulièrement chez les immunodéprimés. L'aptitude de cette espèce à coloniser la surface des polymères (cathéters, prothèses), et les cellules serait liée à l'abondante capsule polysaccharidique produite par ce germe.

2. *S. saprophyticus*

Cette espèce a un nom particulièrement mal choisi puisqu'elle peut être responsable d'infections urinaires qui ont la particularité de s'observer chez des

jeunes femmes habituellement non hospitalisées. Cette espèce serait responsable de 5 à 10 % des infections urinaires en raison de son aptitude à adhérer à l'épithélium urinaire.

3. Les autres espèces

Elles ont un pouvoir pathogène très occasionnel ou même discutable. Pour affirmer leur rôle dans une infection, il est nécessaire d'isoler la souche à plusieurs reprises en l'absence d'une autre espèce bactérienne potentiellement pathogène.

C - Facteurs toxiques élaborés par les staphylocoques coagulase - négatifs

Ces staphylocoques peuvent élaborer des hémolysines de type delta, et parfois une coagulase liée, une fibrinolysine, une leucocidine, une DNase. Pratiquement, les souches isolées d'infections (plaies, hémocultures, abcès) produisent plus fréquemment un ou plusieurs de ces facteurs de virulence que les souches isolées de sujets sains.

IV - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE DES INFECTIONS À STAPHYLOCOQUES

A - Traitement antibiotique

Les antibiotiques ont modifié le pronostic des infections graves comme la staphylococcie maligne de la face. Les infections systémiques à staphylocoques, que ce soit à *S. aureus* ou à *S. epidermidis*, doivent être traitées par une antibiothérapie bactéricide. Cette bactéricidie est généralement obtenue en associant une pénicilline du groupe M à un antibiotique d'une autre famille. La résistance d'une souche à toutes les bêta-lactamines justifie l'emploi d'un antibiotique comme la vancomycine ou la teicoplanine qui sont constamment actifs, mais sont aussi plus lentement bactéricides et plus coûteux.

1. Le problème des bêta-lactamines

al La sécrétion de pénicillinases

— Description du phénomène

Aujourd'hui près de 90 % des souches de staphylocoques isolées en milieu hospitalier et en milieu extra-hospitalier résistent à la pénicilline G par production de pénicillinases qui ouvrent le cycle bêta-lactame de la molécule et inactivent l'antibiotique. Ces pénicillinases sont extra-cellulaires, inductibles et généralement codées par des plasmides.

Elles inactivent les pénicillines G et V, les aminopénicillines, les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Par contre elles ont peu d'affinité pour la méticilline, l'oxacilline, la cloxacilline et toutes les céphalosporines qui restent actives sur ces souches productrices de pénicillinases. Ces pénicillinases sont inhibées par l'acide clavulanique.

— Détection de la résistance enzymatique

La production de pénicillinase est détectée en observant sur l'antibiogramme standard la zone d'inhibition autour d'un disque de pénicilline G. Elle se traduit par une diminution du diamètre d'inhibition par rapport à une souche sensible, non

productrice de pénicillinase. Une souche sensible présente un grand diamètre d'inhibition avec une bordure floue, appelée zone fantôme, qui correspond à une lyse des bactéries. Une souche résistante par production de pénicillinases donne une zone d'inhibition plus petite à bord net. A la périphérie de cette zone d'inhibition se trouvent des colonies bien développées appelées « colonies squatters ».

En pratique le disque de pénicilline G est suffisant sur l'antibiogramme pour détecter la résistance à toutes les pénicillines. Les souches possédant une pénicillinase doivent être considérées comme résistantes à ces antibiotiques. On ne doit pas rendre un résultat de sensibilité comme "intermédiaire".

Lorsqu'un doute persiste sur le fait qu'une souche produise ou non une pénicillinase, sa détection peut être faite par test de Gots, test acidimétrique, ou par un test iodométrique ou plus simplement par le test à la nitrocéfine.

bl La résistance intrinsèque ou résistance hétérogène à la méticilline

— Description du phénomène

Ce mécanisme de résistance non enzymatique aux bêta-lactamines a été observé dès 1961, époque de l'introduction de la méticilline en thérapeutique. Les souches qui le possèdent sont dites résistantes hétérogènes à la méthicilline ou « méti R ». Chez une souche méti R, seule une faible proportion des bactéries est capable d'exprimer la résistance et de croître en présence de méticilline.

Les souches méti R doivent toujours être considérées comme résistantes à toutes les bêta-lactamines, y compris aux céphalosporines de 3^e génération et à l'imipénème. Elle sont également productrices de pénicillinases. Elles sont habituellement résistantes à d'autres antibiotiques : aminosides, tétracyclines et macrolides.

De 10 à 40 % des souches hospitalières de *S. aureus* isolées en France sont méti R. Leur fréquence parmi les souches d'origine extra-hospitalière est faible.

Cette résistance est la conséquence de modifications des protéines enzymatiques intervenant dans la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Il existe chez *S. aureus* au moins quatre PLP (Protéines de Liaison à la Pénicilline) encore appelées PBP (Penicillin Binding Protein). Chez les souches méti R on observe une diminution de l'affinité des PBP pour les bêta-lactamines et la synthèse d'une PBP anormale, la PBP 2a dont l'affinité pour les bêta-lactamines est faible.

— Détection de la résistance hétérogène

Il existe des souches résistantes homogènes à haut niveau à la méticilline. Leur détection par antibiogramme ne pose pas de problème.

Plus souvent la résistance est hétérogène et seule une faible fraction des bactéries est capable d'exprimer sa résistance dans des conditions standards de culture. Pour favoriser l'expression de cette résistance à la méticilline sur antibiogramme il est nécessaire de placer un disque de méticilline (ou d'oxacilline qui est plus stable) :

- soit sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton incubée entre 25 et 30°C et observée après 24 et 48 heures.
- soit sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton hypersalée (5 % de NaCl) et incubée à 37°C.

Dans ces conditions, la résistance hétérogène se traduit par la présence de petites colonies dans la zone d'inhibition autour du disque. Ces colonies sont mieux visibles après une incubation de 48 heures

Une résistance à la méticilline doit faire considérer la souche comme résistante à **toutes** les bêta-lactamines. Les expérimentations cliniques ont montré que ces souches étaient effectivement résistantes aux céphalosporines. En pratique, sur l'antibiogramme il n'est utile de tester qu'un seul disque : méticilline ou oxacilline. La résistance hétérogène s'exprimant mal autour des disques de céphalosporines, il est donc inutile de les employer.

En cas de doute sur la mise en évidence de la résistance intrinsèque par antibiogramme il est intéressant d'employer la technique de dilution en gélose. Une dilution de la souche à tester (spot contenant 10^4 CFLJ) est ensemencée sur une boîte de gélose de Mueller-Hinton à 5 % de NaCl contenant 10 mg/1 de méticilline ou 6 mg/1 d'oxacilline. La croissance de la souche sur cette boîte après 24 à 48 h à 35°C la fait considérer comme résistante à toutes les bêta-lactamines.

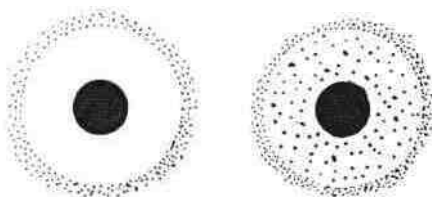
cl La tolérance

Les bêta-lactamines sont des antibiotiques bactéricides. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB) sont normalement voisines.

Le rapport CMB/CMI est de l'ordre de 1 à 2.

La tolérance est un mécanisme de résistance particulier où la CMI est normale mais où la souche n'est lysée que par des CMB très supérieures à la CMI. Une souche est dite tolérante lorsque la CMB est au moins 32 fois supérieure à la CMI.

Ce phénomène concerne tous les antibiotiques intervenant dans la biosynthèse de la paroi (bêta-lactamines, mais aussi vancomycine, fosfomycine) avec parfois des tolérances croisées comme entre les bêta-lactamines et la vancomycine. Cette tolérance est liée à un système peptidoglycane-hydrolase intrinsèque inopérant (défectif). La tolérance est phénotypique, c'est-à-dire réversible et instable. Les souches de *S. aureus* tolérantes sont surtout rencontrées dans les endocardites ; la fréquence actuelle ainsi que la signification clinique de telles souches sont mal établies.



Gélose MH non hypersalée à 37°C Gélose MH hypersalée à 37°C
ou gélose HM non hypersalée à 30°C

SCHÉMA 4 RÉSISTANTS HÉTÉROGÈNES

2. Les autres antibiotiques

al Les aminosides

Ils peuvent être modifiés par diverses enzymes staphylococciques : phosphotransférases, nucléotidyltransférases et acétyltransférases.

Les souches résistantes à la gentamicine sont aussi résistantes à la tobramycine et à la kanamycine (phénotype KTG) et présentent une sensibilité diminuée à la nétilmicine et à l'amikacine, quels que soient les diamètres d'inhibition observés pour ces 2 derniers antibiotiques. De plus, la CMB de l'amikacine est beaucoup plus élevée chez ces souches. En pratique, les souches de *S. aureus* résistantes à la gentamicine doivent être considérées comme résistantes à tous les aminosides usuels (sauf à la streptomycine et à la néomycine qu'il faut tester séparément).

Les souches résistantes à la tobramycine et à la kanamycine (phénotype KT) sont résistantes aussi à l'amikacine et la néomycine mais restent sensibles à la gentamicine et à la nétilmicine.

Les souches présentant le phénotype K Nm (résistance à la kanamycine et à la néomycine) sont également résistantes à l'amikacine.

Ces souches résistantes aux aminosides (particulièrement le phénotype KTG) sont le plus souvent méti R.

bl La vancomycine et la teicoplanine

Constamment actives sur les *S. aureus* même méti R, elles sont utilisées uniquement en milieu hospitalier, particulièrement dans les endocardites et les infections graves. La sensibilité des staphylocoques à coagulase négative à la teicoplanine est moins constante et doit être vérifiée au laboratoire.

cl Les macrolides

En milieu hospitalier, environ 25 % des souches de *S. aureus* résistent à l'érythromycine et un pourcentage un peu plus faible résiste aux lincosamides (lincomycine, clindamycine). Moins de 5 % des souches sont résistantes aux synergistines (pristinamycine, virginiamycine).

La résistance peut être constitutive, c'est-à-dire non induite, et concerne les macrolides, lincosamides et streptogramines B (S_B) (résistance MLS_B). Les streptogramines A (S_A) ne sont pas atteintes et la synergie entre S_A et S_B persiste *in vitro* ; la sensibilité à la pristinamycine et à la virginiamycine semble donc conservée.

Certaines souches de *S. aureus* présentent une résistance aux MLS_g induite par l'érythromycine ou l'oléandomycine. Ces souches sont sensibles à certains macrolides (spiramycine, josamycine, midécamycine), aux lincosamides et aux streptogramines A et B. Par contre elles sont résistantes à l'érythromycine et à l'oléandomycine. L'association de traces d'un de ces deux derniers antibiotiques à l'un des autres antibiotiques du groupe MLS induit une résistance MLS_g identique au type constitutif.

Le phénotype de résistance isolée à la lincomycine seule ou associée à la résistance aux streptogramines A (LS_A) est encore rarement rencontré en France.

dl Le chloramphénicol, les cyclines et le cotrimoxazole

Ils ne peuvent être considérés comme des antistaphylococciques de choix.

el La rifampicine

Elle reste très active mais doit toujours être utilisée en association pour éviter la sélection de mutants résistants.

// Autres antibiotiques

Ils viennent prendre une place intéressante parmi les antibiotiques antistaphylococciques, même pour traiter les souches méti R, à condition d'être utilisés en association ; il s'agit de :

- l'acide fusidique
- la fosfomycine (95 à 100 % de souches sensibles)
- les fluoroquinolones (péfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacine...).

En pratique, là où l'antibiothérapie bactériostatique est suffisante (infection ORL, cellulites, furoncles,...) on peut utiliser des produits du type pristinamycine, mais pour les infections graves (septicémies, endocardites, pneumopathies, ostéomyélites, choc toxique,...) on doit obtenir un effet bactéricide et on peut utiliser :

- si la souche est méti S, une association bêta-lactamine (oxacilline ou céfalotine) - et aminoside,

- si la souche est méti R, des associations vancomycine et aminoside combinées ou non à la rifampicine, ou bien péfloxacin associée à la fosfomycine ou à un aminoside ou bien parfois céfotaxime-fosfomycine. Le choix est alors guidé par les études d'activités bactéricides des associations *in vitro*, et éventuellement par l'étude du pouvoir bactéricide du sérum sur la souche impliquée.

Les souches appartenant à des espèces autres que *S. aureus* sont fréquemment multirésistantes et méti R (35 à 66 % des souches) ; elles sont toutes sensibles à la vancomycine.

Signalons que la fosfomycine est toujours inactive sur *S. saprophyticus*.

Les plus grandes difficultés thérapeutiques sont rencontrées avec les endocardites ou les méningites à *S. epidermidis* et, dans ces cas, l'étude *in vitro* d'associations est nécessaire.

A noter enfin que certaines souches de staphylocoques peuvent acquérir des résistances vis-à-vis d'antiseptiques notamment mercuriels, ce qui peut favoriser la diffusion de telles souches en milieu hospitalier.

B - Prophylaxie

1. Individuelle

Le portage sain ne constitue pas un danger pour le sujet lui-même. Mais chez un sujet porteur de furonculose chronique, il faut éliminer ce portage.

Lors d'une lésion staphylococcique évolutive, il faut éviter une septicémie. Des essais de vaccins à base de staphylocoques ou d'anatoxine n'ont pas débouché sur des résultats convaincants.

2. Collective

Il conviendrait théoriquement d'éviter l'emploi de porteurs de germes dans la restauration collective.

La lutte contre les staphylocoques hospitaliers est un problème fondamental d'hygiène hospitalière fondé sur l'observation des règles d'asepsie, l'éducation du personnel et la rationalisation de l'emploi des antibiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

BRUN Y., FLEURETTE J., FOREY F., « Micromethod for biochemical identification of coagulase-negative staphylococci ». *J. Clin. Microbiol.*, 1978, **8**, 503-508.

BRUN Y., BES M. « Méthodes diagnostiques des Staphylocoques coagulase négatifs », *Méd. Mal. Infect.*, 1990, 20, n° hors série, 16-23.

EL SOLH N., « Infections staphylococciques liées à la production de toxines bactériennes ». *Gaz. Méd. de France*, 1983, 90, 3877-3888.

FLEURETTE J., « Staphylocoques et Microcoques » in *Bactériologie Médicale. Le Minor et J. Véron*, Ed., Médecine-Sciences Flammarion, 1990, 773-794.

GOULLET P., « Les toxines staphylococciques et leur action pathogène ». *Nouv. Presse Méd.*, 1981, **10**, 2163-2165.

KLOOS W.E., SCHLEIFER K.H., « Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species ». *J. Clin. Microbiol.*, 1975, **1**, 82-88.

LEPORT C., PERRONNEC C., VILDE J.L., « Les infections à staphylocoques à coagulase négative. Facteurs liés à l'hôte », *Méd. Mal. Infect.*, 1990, 20, n° hors série, 46-51.

LYON B.R., SKURRAY R., « Antimicrobial résistance of *Staphylococcus aureus* : Genetic basis ». *Microbiol. Rev.*, 1987, **51**, 88-134.

MELCONIAN A.K., FLEURETTE J., BRUN Y., « Studies on staphylococci from toxic shock syndrome in France 1981-1983 ». *J. Hyg. Camb.*, 1985, 23-29.

SEWELL C.M., CLARRIDGE J.E., YOUNG E.J., GUTHRIE R.L., « Clinical significance of coagulase-negative staphylococci ». *J. Clin. Microbiol.*, 1982,**16**, 236-239.

VACHON F., REGNIER B., « Les infections à staphylocoques méticilline-résistants ». Monographie de la série : *Problèmes actuels de Pathologie infectieuse et de Réanimation*. Librairie Amené, 1984.

WINSTON D.J., DUDNICK D.W., CHAPIN M., *et al.*, « Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in patients receiving immunosuppressive therapy ». *Arch. Intern. Med.*, 1983, **143**, 32-36.

A signaler : le numéro de *la Revue du Praticien* (1982, tome XXXII) sur les Infections à Staphylocoques et le N° spécial « Les staphylocoques - coagulase négatifs et leur pathologie », *Méd. Mal. Infect.*, Mars 1990, **20**, N° Hors série.

Chapitre n

STREPTOCOCCUS - ENTEROCOCCUS

HISTORIQUE

En 1874, le chirurgien viennois Christian Billoth observe dans des lésions d'érysipèle un micro-organisme en forme de chaînettes.

En 1875, Louis Pasteur observe ce micro-organisme dans les sécrétions vaginales et le sang de malades atteintes de fièvre puerpérale, mais dès 1869 à Strasbourg Coze et Feitz avaient déjà observé, lors d'une épidémie de fièvre puerpérale, de nombreux "points" disposés en chaînettes dans le sang d'une femme décédée.

En 1884, Rosenbach décrit avec précision *Streptococcus pyogenes*.

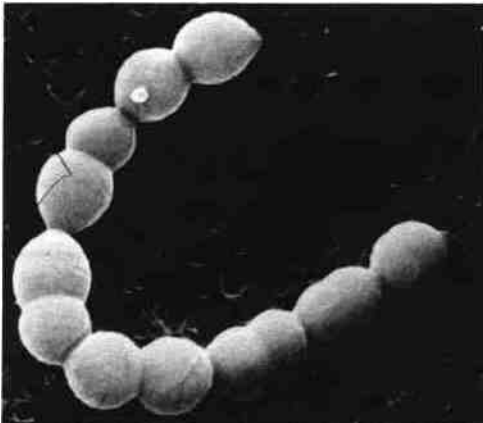
Au début de ce siècle, Schottmuller fait une relation entre le caractère hémolytique des souches et le pouvoir pathogène ; puis Brown utilise l'hémolyse comme critère de classification.

En 1933, Rebecca Lancefield établit la classification moderne des streptocoques basée sur les propriétés antigéniques des hydrates de carbone.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES STREPTOCOQUES

Le genre *Streptococcus* rassemble des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères.

1. Leur morphologie



Ce sont des cocci à Gram positif, sphériques ou ovoïdes, disposés en paire pour former des diplocoques et pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne sporulent pas.

2. Leurs propriétés métaboliques

- Ils ne possèdent ni catalase (à la différence des staphylocoques), ni oxydase (à la différence des *Neisseria*).
- Ils peuvent se développer en aérobiose, ont un métabolisme fermentatif et **sont à considérer** comme des anaérobies tolérant l'oxygène.

Des bactéries anaérobies strictes ont la même morphologie et appartiennent **au** genre *Peptostreptococcus*.

Le genre *Streptococcus* regroupe de nombreuses espèces. L'une d'elles *Streptococcus pneumoniae*, en raison de son importance clinique et de ses particularités sera envisagée séparément.

Parmi les autres, il en est qui partagent des points communs particuliers qui leur ont valu d'être rassemblées dans un nouveau genre : *Enterococcus*.

Enfin, il a été récemment proposé de regrouper les streptocoques lactiques dans le genre *Lactococcus*.

Le tableau ci-dessous regroupe les caractères bactériologiques qui permettent de distinguer *Streptococcus pneumoniae* des autres streptocoques.

TABLEAU 1

	<i>S. pneumoniae</i>	Autres streptocoques et entérocoques
Capsule	+(a)	généralement -
Pathogénicité souris	+(a)	+ou -
Structure Ag groupe	capsulaire	polysaccharide C
Classification Ag.	Lund	Lancefield
Sensibilité optochine	+(b)	
Lyse par la bile	+(b)	
Hémolyse	a	a, P et γ

(a) sauf souches R et quelques exceptions

(b) sauf 10 % des souches.

II - CLASSIFICATION

Il n'existe pas de critère unique qui permette de classer les différentes espèces du genre *Streptococcus*.

La classification fait appel à l'étude de trois types de caractères bactériologiques.

1. L'hémolyse

Elle permet de distinguer des souches a, p ou non hémolytiques (y). **Ce critère** ancien n'a plus aujourd'hui qu'une valeur d'orientation.

2. La classification de Lancefield (1933)

Elle s'appuie sur des critères immunologiques qui permettent de détecter des antigènes spécifiques de groupe.

La plupart des espèces de streptocoques, notamment bêta-hémolytiques, possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques permettent de définir des groupes sérologiques.

La classification de Lancefield distingue 20 groupes sérologiques (désignés par des lettres de A à H et de K à W).

Certaines espèces sont dépourvues de cet antigène polysaccharidique ; ce sont souvent des souches non hémolytiques ou donnant une hémolyse dite a *viridans*.

Elles ne peuvent donc pas être classées par la méthode de Lancefield. Ces streptocoques non groupables sont classés en espèces grâce à l'étude de leurs caractères cultureux et métaboliques.

3. Caractères cultureux et *métaboliques*

Ils permettent de classer les espèces non groupables par la méthode de Lancefield, mais aussi au sein de certains groupes de Lancefield de reconnaître différentes espèces : c'est le cas par exemple du groupe C qui est constitué de 4 espèces : *S. equi*, *S. equisimilis*, *S. dysgalactiae* et *S. zooepidemicus*.

4. Récemment il est apparu que les classifications devaient tenir compte d'autres critères tels que le GC%, la comparaison des ARN ribosomiaux 16S, l'hybridation ADN-ADN, la composition de la paroi (type muréine) et le type des ménaquinones (Schleifer et Klipper-Balz).

D a découlé de ces éléments combinés aux critères précédents que les *Streptococcus* devaient éclater en trois genres : *Streptococcus stricto sensu*, *Enterococcus* et *Lactococcus*. Au sein des *Streptococcus* on distingue les streptocoques pyogènes, les streptocoques de la flore buccale et les autres (Tableau II).

TABLEAU H
CLASSIFICATION DES *STREPTOCOCCUS-ENTEROCOCCUS*
ET *LACTOCOCCUS* d'après Schleifer et coll. adapté

ESPÈCES (Groupes)	
streptocoques pyogènes	<i>S. pyogènes</i> (A) <i>S. dysgalactiae (equisimilis)</i> (C,G,L) <i>S. equi</i> (C) <i>S. agalactiae</i> (B)
streptocoques oraux de la flore buccale	Groupe " <i>S. oralis</i> " " <i>S. milleri</i> ", <i>anginosus</i> <i>constellatus</i> , <i>intermedius</i> <i>S. sanguis</i> (H,W) (<i>S. mitis</i>) <i>S. oralis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. salivarius</i> (K) Groupe " <i>S. mutons</i> " <i>S. mutons</i> , <i>rattus</i> ...
autres streptocoques	(<i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i>) (D) <i>S. suis</i> (R,S,RS,T) <i>S. porcinus</i> (E,P,U,V) (<i>S. uberis</i>)
entérocoques	<i>E. faecalis</i> (D) 3 biotypes <i>E. faecium</i> (D) 3 biotypes <i>E. durons</i> (D) 2 biotypes <i>E. avium</i> (D)
lactocoques	<i>L. lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i> (N)

III - HABITAT

Les streptocoques sont ubiquitaires.

Certains d'entre eux sont rencontrés dans le milieu extérieur. Ils peuvent survivre longtemps dans celui-ci ; ainsi la découverte d'entérocoques dans les eaux ou les aliments signe une contamination fécale d'origine humaine ou animale.

D'autres sont plus fragiles et vivent à l'état commensal au niveau des téguments ou des muqueuses de l'homme ou des animaux. Les entérocoques et des streptocoques *viridans* plus résistants sont des commensaux constants des voies digestives et de la flore buccale.

La présence normale de streptocoques au niveau cutanéomuqueux explique qu'ils peuvent contaminer fréquemment des prélèvements et constituer des souillures.

Récemment une épidémie d'infections à *S. pyogenes* d'origine alimentaire a été décrite.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

A - Rôle de l'adhérence

Le développement d'une infection streptococcique dépend des capacités d'adhérence de la bactérie à la surface des cellules de l'organisme. Les bactéries se fixent au niveau des surfaces cellulaires grâce aux fimbriae, aux protéines de surface, aux acides lipoteichoïques, peut-être aux protéines M. Ces structures jouent un rôle important dans l'adhérence des streptocoques. Ainsi pour les streptocoques A, les anticorps dirigés contre les antigènes de groupe, de type ou les acides teichoïques diminuent l'adhérence.

Pour les streptocoques buccaux, les polymères de haut poids moléculaire, tels les dextrans ou lévanes (PM > 200 000), jouent un rôle important dans la fixation de ces streptocoques (*S. sanguis*...) après bactériémie au niveau du tissu cardiaque ou sur place au niveau de la plaque dentaire (*S. mutans*...). Pour cette dernière espèce, la synthèse de dextrane se fait à partir du glucose ou du saccharose sous l'influence de glucosyltransférase ou de fructosyltransférase.

On a pu montrer par des endocardites expérimentales une relation entre l'aptitude à produire du dextrane et l'aptitude à provoquer une endocardite. L'adhésion au niveau des tissus cardiaques requiert un nombre minimal de bactéries. Cette fixation est rapide et les bactéries sont dans les 24 heures recouvertes de fibrine, ce qui les protège de la phagocytose. Seules les bactéries de surface sont métaboliquement actives. Celles qui sont enchâssées dans les végétations ou la fibrine ont une activité diminuée, elles sont donc plus difficiles à détruire par les antibiotiques.

La production de dextrane par les streptocoques buccaux (*S. mutans* et *S. sanguis*) permet à ces espèces d'adhérer à l'émail des dents et favorise l'adhésion d'autres espèces bactériennes grâce aux fibres polysaccharidiques de surface que sont les « glycocalyx ». Cela explique que si *S. sanguis* et *S. mutans* représentent 90 % de la flore de la plaque, d'autres espèces notamment anaérobies sont présentes. Les dextrans et lévanes présents sont dégradés par les bactéries de la plaque. Ils sont métabolisés en entrant dans le cycle des fermentations, avec production d'acides pyruvique, lactique, propionique, butyrique... qui entraînent la destruction des cristaux d'apatite de l'émail, qui sera suivie d'une désorganisation organique de l'émail, donc de carie.

B - Le rhumatisme articulaire aigu (RAA)

Pour expliquer le rhumatisme articulaire aigu dû au streptocoque de groupe A. (*S. pyogenes*) deux théories existent :

L La première théorie autoimmune est argumentée par :

- L'existence d'une période de latence entre l'infection streptococcique et le développement du rhumatisme.

L'exagération de la réponse anticorps chez les sujets avec RAA par rapport aux autres.

La réaction des anticorps antistreptococciques A vis-à-vis des myofibrilles et des valves cardiaques avec dépôt d'immunocomplexes et de complément au niveau de ces structures, ainsi que des neurones subthalamiques et des noyaux caudés du système nerveux central. De même on retrouve un accroissement du taux des immunoglobulines et une diminution des taux de C1, C4 et C3 dans le liquide synovial des sujets présentant une polyarthrite rhumatoïde.

TABLEAUff
RÉACTIONS CROISÉES ENTRE STREPTOCOQUE A ET TISSUS HUMAINS

Structures impliquées

Streptocoque A	Tissus Humains
Paroi	Sarcoleme et
Membrane cellulaire	Subsarcoleme
Antigène de groupe A	Noyaux caudés et subthalamiques
Acide hyaluronique	Glycoprotéines des valves
	Tissus articulaires.

2. La seconde théorie d'hypersensibilité

Les lymphocytes T sensibilisés pourraient réagir avec les antigènes streptococciques et relâcher des lymphokines en quantité exagérée. Plaident en faveur de cette hypothèse, l'augmentation de la réponse lymphocytaire proliférative lors des poussées du RAA mais également une association de cette réponse avec une prédisposition génétique de certains individus liée aux groupes tissulaires (HLA-A 35).

Toutefois c'est la théorie d'une maladie autoimmune qui est le plus souvent avancée.

C - La glomérulonéphrite post-streptococcique

La physiopathologie de la glomérulonéphrite aiguë post-streptococcique est expliquée par diverses théories :

- Le mécanisme le plus souvent invoqué est le dépôt de complexes immuns antigène-anticorps dans les capillaires de la membrane basale glomérulaire,
- la formation d'anticorps provoquerait des altérations des protéines de l'hôte **ou** des antigènes glomérulaires.
- les réactions croisées entre glomérules et streptocoques néphritogènes existent.
- un effet toxique direct des toxines ou produits d'origine streptococcique sur les membranes basales glomérulaires peut intervenir.
- la persistance de formes latentes (forme L) après épisode initial a aussi été invoquée.

Mais aucune de ces hypothèses ne suffit à elle seule pour expliquer la pathogénèse des glomérulonéphrites post-streptococciques. Ces quelques exemples donnent une idée de la complexité de la physiopathologie des infections streptococciques.

V - POUVOIR PATHOGENE

A - *Streptococcus pyogenes* (groupe A)

La pathologie est très variée et la physiopathologie complexe ; on peut distinguer arbitrairement :

-Les manifestations locales et régionales :

ORL

- angines érythémateuses ou érythémato-pultacées
- abcès périamygdaliens, adénites cervicales, adénophlegmons
- rhinites, sinusites, otites suppurées, mastoïdites

cutanées

- érysipèle, impétigo
- cellulite, fasciites nécrosantes, myonécrose
- surinfections de plaies et de brûlure, d'ulcères
- vulvovaginites, anites, redites
- érythème noueux

-Les manifestations générales

- précoces : scarlatine, septicémies, endocardites (rares), localisations suppurées articulaires, pleuropulmonaires, méningées... des "toxic shock syndroms" like ont été signalés.
- post-streptococciques : rhumatisme articulaire aigu avec ou sans cardite, glomérulonéphrite, chorée.
- les streptocoques des groupes C et G ont un pouvoir pathogène analogue au groupe A. Les complications post-streptococciques sont plus rares.

B - *Streptococcus agalactiae* (groupe B)

- Infections périnatales :

Au moment de l'accouchement 1 à 2 % des enfants sont colonisés, soit au moment du travail (infection ascendante) soit lors de l'accouchement, mais seulement 1 enfant sur 10 fera une infection.

L'enfant peut présenter :

une forme précoce grave, survenant avant le 10^e jour de la vie, avec détresse respiratoire, parfois septicémie et méningite.

une forme tardive apparaissant après le 10^e jour, souvent méningée.

- Autres infections pouvant être observées chez l'adulte :
 - ostéo-arthrites,
 - infections urinaires, génitales, cutanées,
 - pleuropneumopathies,
 - septicémies, endocardites, méningites.

C - Entérocoques, streptocoques du groupe D et streptocoques non groupables dits «viridans»

- Bactériémies et septicémies sans localisations pyogènes (espèces diverses dont *E. faecalis*)
- Endocardites : certaines espèces sont impliquées en priorité (tableau IV) notamment *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. mutons*, *S. bovis* (cette dernière espèce est souvent retrouvée associée à des tumeurs coliques).
- Infections urinaires (entérocoques, principalement *E. faecalis*).
- Caries dentaires (*S. mutons*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. milleri*...)

D - Autres streptocoques

Différents sérogroupes peuvent être retrouvés dans des septicémies, des endocardites, des méningites (en particulier *S. suis* isolé lors de méningites chez des charcutiers).

TABLEAU IV
FRÉQUENCE RELATIVE DES DIFFÉRENTS STREPTOCOQUES IMPLIQUÉS DANS DES ENDOCARDITES INFECTIEUSES, D'APRÈS DEUX STATISTIQUES PORTANT SUR UN GRAND NOMBRE DE CAS

	Etienne 1982	Paricer 1978
S. Groupes A-B-C-G	5,1	5,0
Groupe D		
- <i>E. faecalis</i>	15,6	5,7
- <i>E. bovis</i>	9,6	17,3
<i>S. milleri</i>	5,2	5,4
<i>S. mitis</i>	16,5	13,2
<i>S. mutans</i>	2,7	14,2
<i>S. salivarius</i>	1,7	1,8
<i>S. sanguis</i>	36,6	23,7
S.inclassables	7,0	7,9

VI - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Les streptocoques et les entérocoques se présentent sous forme de cocci à Gram positif. La taille de chaque élément est inférieure à 2 μm ; elle varie avec les espèces. Les cocci sont ronds ou ovalaires, le grand axe étant alors dans le sens de la chaînette. En cas de souffrance (antibiotiques, mutants déficients) des formes pseudobacillaires ou monstrueuses peuvent être observées, elles prennent parfois mal le Gram. Les éléments sont groupés en chaînettes plus ou moins longues (de 2 à plus de 50 cocci) ; la division se faisant perpendiculairement à l'axe de la chaîne. Les éléments sont * souvent rapprochés en diplocoques au sein de la chaîne.

Ils sont immobiles (à l'exception de quelques entérocoques : *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*).

Une capsule peut être observée avec certaines espèces.

B - Caractères cultureux

1. Conditions de culture

- Une atmosphère enrichie en CO_2 favorise les primocultures.
- La température optimale est de 37°C, mais les entérocoques poussent aussi à 45°C.
- Le pH optimal est de 7,3. Les entérocoques peuvent croître en bouillon à un pH atteignant 9,6. Un pH acide est néfaste à la croissance de la plupart des streptocoques en effet, il se produit une acidification secondaire d'où l'intérêt du milieu tamponné de Todd - Hewitt.

2. Aspect des colonies

La quasi totalité des espèces se développent bien sur milieux riches type gélose Columbia.

Après 24-48 heures de culture, les colonies des streptocoques de groupe A, C et G ont un diamètre de 0,5 mm ; elles sont transparentes, translucides, en dôme (S). Celles du groupe B sont plus larges (S), parfois pigmentées en jaune-orange en anaérobiose.

Celles du groupe D (entérocoques) sont souvent larges 0,5-1 mm, plus opaques, et souvent blanchâtres et peuvent ressembler à des colonies de staphylocoques. Celles des espèces non groupables ont des tailles variables allant de 0,1 à 0,5 mm, ont des aspects mucoïdes et brillants, elles sont parfois translucides.

A noter que les streptocoques des groupes A, C et G peuvent donner des petites colonies « minutes », tout comme les streptocoques du groupe F.

3. L'hémolyse

L'étude de l'hémolyse autour des colonies sur gélose à 5 % de sang (de mouton ou de cheval) permet une première orientation diagnostique.

- Description

On distingue :

- L'hémolyse α : incomplète avec verdissement du milieu ;
- L'hémolyse β : totale avec éclaircissement de la gélose autour des colonies (diamètre 3-4 mm). L'hémolyse observée en milieu aérobie est due à l'action de la streptolysine S. Cette hémolyse est nette en 24 à 48 heures, quelquefois après séjour à 4°C. Une hémolyse β en cocarde avec hémolyse totale à distance de la colonie et hématies intactes au contact de la colonie est parfois observée.
- L'absence d'hémolyse (γ).

- Facteurs influençants

- L'atmosphère d'incubation : l'anaérobiose favorise l'hémolyse β de certains streptocoques A.
- La composition du milieu : le glucose empêche l'apparition de l'hémolyse sur gélose au sang frais avec les streptocoques de groupe A, caractère utilisé à des fins de diagnostic. Le nucléinate de sodium, par contre accentue l'hémolyse ;
- L'épaisseur du milieu joue également un rôle dans la visualisation de l'hémolyse.

- Camp-test

En mettant en présence une souche de streptocoque B (produisant une protéine extracellulaire appelée Camp-factor) et un *Staphylococcus aureus* produisant une β -hémolysine, on observe au point de rencontre des deux substances une zone d'hémolyse complète avec un aspect en écaille.

4. Milieux sélectifs

Beaucoup de produits contenant des streptocoques étant polymicrobiens, il est utile de recourir à des milieux sélectifs. Ces milieux permettent parfois d'orienter vers un diagnostic de groupe ou d'espèce (milieux hostiles pour les groupes D par exemple). On dispose de milieux sélectifs d'enrichissement ou d'isolement.

- milieu à l'azide de sodium (inhibe les Gram -) et au cristal violet (inhibe les staphylocoques) ; deux milieux sont employés pour la recherche des entérocoques dans les eaux : le milieu de Rothe et le milieu de Litsky.

milieu de Todd-Hewitt modifié pour isoler les streptocoques B, milieux ac. nalidixique + gentamicine ou polymyxine cristal-violet.

TABLEAU V
TESTS DE PRÉIDENTIFICATION

GROUPE	Groupe D				<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i> **	<i>S. viridans</i>	<i>S. pneumoniae</i>
	A	B	C	G				
Hémolyse	p	a-P	P	p	a*	a	a	a
Bile-esculine	-	-	-	-	+	+	(-)	-
NaCl 6,5 %	-	(+)	-	-	+	-	-	-
Bacitracine	S	(R)	(R)	(R)	R	R	(S)	(S)
Hippurate	-	+	-	-	(-)	-	(-)	-
Optochine	R	R	R	R	R	R	R	S

* P pour *E. faecalis* var. *zymogenes* ; () quelques exceptions ; S=sensible ; R= résistant

** *S. bovis*, *S. equinus*

C - Diagnostic de présomption

Cinq caractères combinés permettent une préidentification avec une approximation intéressante (Tableau V), ce sont :

1. L'hémolyse

dont l'aspect a ou p a été décrit plus haut

2. Le test bile-esculine

Le milieu « bile-esculine » contient 40 % de bile. Il ne doit pas être confondu avec le milieu à l'esculine, qui ne doit pas être utilisé comme test de présomption. La culture et le noircissement du milieu bile-esculine est très spécifique des streptocoques de groupe D. Parmi les streptocoques *viridans*, des souches bile-esculine positives peuvent s'observer avec *Streptococcus mutons*.

3. Le bouillon à 6,5 % de NaCl

Le test de tolérance au NaCl permet de distinguer les entérocoques des autres streptocoques de groupe D. Mais il n'est pas très spécifique puisqu'environ 80 % des streptocoques de groupe B montrent ce caractère.

4. La sensibilité à la bacitracine

Ce test a été très critiqué car c'est une épreuve mal standardisée : la charge des disques n'est pas toujours précisée par les fabricants ; la densité de l'inoculum varie ; le diamètre de la zone d'inhibition considéré comme significatif, n'est pas toujours le même. Maxted, qui a décrit ce test, n'a pas défini le diamètre de la zone d'inhibition.

Si l'on retient toute zone d'inhibition quel qu'en soit le diamètre, la presque totalité des streptocoques du groupe A est sensible à la bacitracine.

5. L'hydrolyse de l'hippurate de sodium

Presque tous les streptocoques du groupe B hydrolysent l'hippurate de sodium. Mais ce caractère est trouvé avec certains streptocoques de groupe D et quelques *Streptococcus viridans*.

Il faut souligner au sujet de ces tests de présomption, que la totalité des *Listeria* donne une réaction positive sur le milieu bile-esculine et que deux tiers des souches

de *Listeria* hydrolysent l'hippurate. La recherche de la catalase est donc importante pour l'identification d'un streptocoque.

D - Diagnostic de certitude

L'identification précise d'un streptocoque repose sur l'étude de ses caractères antigéniques et sa classification dans les groupes de Lancefield. Pour les espèces dépourvues d'antigène de groupe l'identification repose uniquement sur l'étude des caractères physiologiques et métaboliques.

1. Structure antigénique et classification séroïogique

a) Antigènes structuraux

Leur localisation est indiquée sur le schéma d'un streptocoque-entérocoque « idéal » (figure 1)

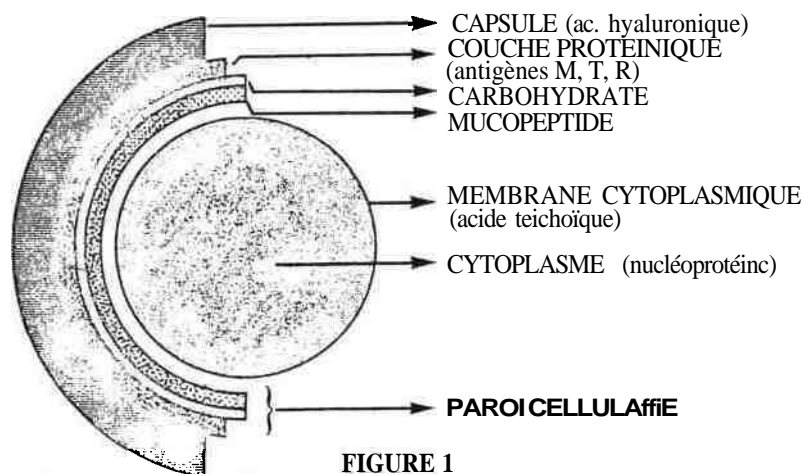


FIGURE 1
REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES COMPOSANTS CELLULAIRES DES STREPTOCOQUES DU GROUPE A (Modifié d'après R.M.KRAUSE)

a) Antigènes capsulaires :

Différentes catégories d'antigènes peuvent être distinguées selon leur composition :

- acide hyaluronique : streptocoques du groupe A (*S. pyogenes*), et certains streptocoques du groupe C (*S. equi* et *S. zooepidemicus*).
- polysaccharides et protéines spécifiques de type pour les streptocoques de groupe B
- dextrans retrouvés chez certains représentants du groupe D (*S. bovis* I) ou non groupables (*S. sanguis*, *S. mutons*) ou lévanes (*S. salivarius*).

P) Antigènes liés à la paroi :

Les antigènes de groupe ont permis la classification de Lancefield, ils sont :

- soit polysaccharidiques : polysaccharide C des groupes A-B-C-E-F-G-H-K-L-M-O-P-R-S-T-U-V.
- soit à base d'acides teichoïques : groupes D et N.

Les antigènes de groupe ont été particulièrement bien étudiés, pour les groupes A et C : polymères de rhamnose-N-acétylglycosamine, avec des variants et pour le groupe B : rhamnose-N-acétylglycosamine-galactose.

Pour le groupe D, les antigènes de groupe ne seraient peut-être pas situés dans la paroi, mais seraient présents dans la membrane cytoplasmique ou le cytoplasme.

Les antigènes de type sont en position souvent plus externe que les antigènes de groupe ; ils sont situés dans la couche pariétale externe pour le groupe A ; ils sont

- soit de nature protéique : protéines M (liée aux pili), **R**, T parfois associées à de l'acide lipoteichoïque,
- soit de nature polysaccharidique par exemple pour le groupe D et pour certains streptocoques non groupables (*S. mutans*).

En profondeur on trouve une couche interne qui correspond au peptidoglycane ou mucopeptide (chaînes de N-acétylglucosamine-acide N-acétylmuramique reliées par des tétrapeptides).

y) Antigènes cytoplasmiques

Le cytoplasme contient un ensemble complexe nucléoprotéique ; les acides teichoïques des groupes D sous forme libre ou liée aux lipides, soit à ce niveau, soit au niveau de la membrane cytoplasmique.

Cas particuliers

Streptocoques du groupe A :

Les antigènes structuraux ont été particulièrement bien étudiés (Figure 1). Parmi les antigènes intéressants en épidémiologie et pour la physiopathologie, on retrouve :

- Les protéines M qui confèrent
 - . une résistance à la phagocytose
 - . une spécificité de type (plus de 75 types), certains liés à la pathologie (Tableau VI).

TABLEAU VI
RELATION ENTRE TYPE DE STREPTOCOQUE A ET TABLEAUX CLINIQUES

Entité clinique		Types
Scarlatine		Tous ⁰
RAA		Tous
Glomérulo-néphrite-aiguë	Infection initiale	
	- pharyngée :	12, 14, 18
	- cutanée :	49, 2, 31, 52, 55, 57, 60
Erysipèle		49 et 13 autres types

⁰ si lysogénisés par un phage induisant la toxine érythroène

La connaissance des propriétés chimiques des protéines M, de leur rôle et de leur place dans une perspective vaccinale a progressé récemment (Fischetti).

- Les protéines T qui peuvent être communes à plusieurs types M. De plus les types M peuvent posséder plusieurs types T.

-Le facteur d'opacité du sérum (SOF) a été révélé chez 16 types M.

Le typage antigénique des streptocoques A comporte donc le type M, le type T et le type SOF.

Streptocoques du Groupe B :

La sérotypie repose sur la connaissance des antigènes polysaccharidiques et protéiques constitutifs, comme cela ressort du tableau emprunté à Geslin (Tableau VII) ; cette sérotypie a fait l'objet de propositions internationales de nomenclature : le type le deviendrait le type Ia/c ; et de nouveaux types ont été proposés : type IV et NT1 notamment...

Cette sérotypie a un intérêt épidémiologique et pronostique. Ainsi chez les nouveau-nés le type I provoquerait une infection néonatale rapide, avec mortalité élevée, alors que le type III provoquerait des infections différées avec mortalité moindre.

TABLEAU Vn
FORMULES ANTIGÉNIQUES DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* (GROUPE B)

Sérotypes	Antigènes polysaccharidiques	Andgènes protéiques
la	la, labc	(R ou X)
Ib	Ib, labc	Ibc, (R ou X)
le	la, labc	Ibc, (R ou X)
II	n	(Ibc), (R ou X)
m	m	(Ibc), (R ou X)
R		R, (Ibc)
X		X, (Ibc)
NT (1)		(Ibc)

(1) Non typable () Facultatif

bl Antigènes extracellulaires

Certains streptocoques produisent des substances extracellulaires dont certaines sont antigéniques ; elles ont été particulièrement étudiées pour le streptocoque de groupe A (figure 2).

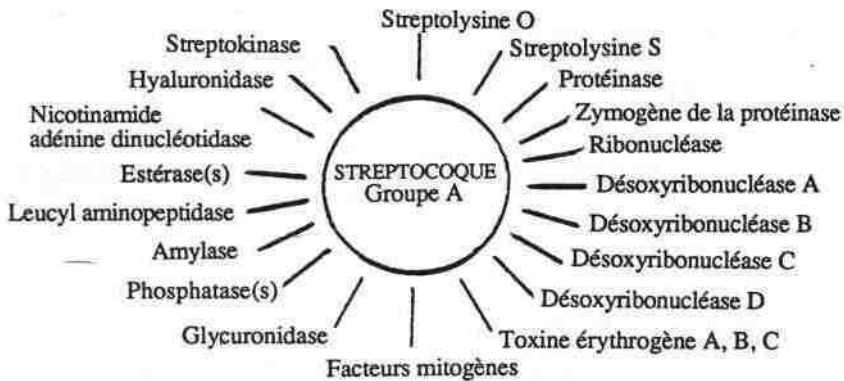


FIGURE 2
COMPOSANTS EXTRACELLULAIRES LIBÉRÉS PAR LES STREPTOCOQUES DU GROUPE A

Parmi les antigènes extra-cellulaires on retrouve :

- la toxine érythrogyne responsable de l'éruption observée dans la scarlatine et produite par les souches lysogènes
- la streptolysine 0 (oxygène labile),
- la désoxyribonucléase sous 4 formes antigéniques : A, B, C et D.
- les hyaluronidase, streptokinase, diphosphopyridine-nucléotidase...

2. Étude des caractères physiologiques et métaboliques

Elle permet d'identifier des espèces dépourvues d'antigènes de groupe. Elle permet aussi au sein de certains groupes sérologiques de reconnaître différentes espèces.

a/ Les caractères utilisés sont :

- des caractères physiologiques, avec étude
 - de la croissance à 10°C et à 45°C en milieu salé ou à pH 9.6 en présence d'antibiotiques ou d'antibactériens
 - de la résistance au chauffage
 - de la réduction du tellurite ou du tétrazolium

* des caractères biochimiques, en étudiant les métabolismes :

* glucidiques

- . l'attaque de certains sucres aide à l'identification. Il s'agit d'un métabolisme fermentatif (homofermentatif) ; le produit principal final de l'attaque du glucose étant l'acide D-lactique avec ou sans formation d'acétoïne (VP) ; les sucres utilisés sont surtout le lactose, le mannitol, le sorbitol ; l'hydrolyse de l'esculine et de l'amidon peut être recherchée.
- . la production de glucanes (dextranes ou lévanes) est recherchée sur milieu hypersaccharosé.

* protéiques avec recherche d'hydrolyse de la gélatine, de l'arginine.

* la recherche de certaines enzymes est pratiquée : galactosidase, DNase etc.

bl **Subdivision des groupes C et D**

L'étude de ces caractères permet de porter des diagnostics d'espèce, voire de biotype au sein de certains sérogroupes tel :

- . le groupe C : avec 4 espèces (Tableau VIII)
- . le groupe D du genre *Enterococcus* ou non (Tableau IX).

TABLEAU Vffii
CARACTÈRES QUI PERMETTENT D'IDENTIFIER AU SEIN DES STREPTOCOQUES DU SÉROGROUPE C LES DIFFÉRENTES ESPÈCES

	Hémolyse	Lactose	Tréhalose	Sorbitol	Origine
<i>S. equisimilis</i>	Bêta	var.	+	-	Homme
<i>S. zooepidemicus</i>	Bêta	+	-	+	Animale
<i>S. equi</i>	Bêta	" -	-	-	Animale Cheval
<i>S. dysgalactiae</i>	Non hémolytique	+	+	var.	Animale Vache

L'espèce *E. faecalis* peut elle-même être subdivisée en trois sous-espèces : *E. faecalis* var. *zymogenes* a une hémolyse bêta, *E. faecalis* var. *liquefaciens* liquéfie la gélatine et *E. faecalis* var. *faecalis* n'a aucun des deux caractères cités. D'autres *Enterococcus* ont été décrits : *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* (tous deux mobiles), *E. malodorus*, *E. hirae*, *E. mundtii* (ces deux derniers pigmentés en jaune comme *E. casseliflavus*).

cl **Classification des streptocoques dépourvus d'antigène de groupe ou streptocoques viridans** (streptocoques oraux)

TABLEAU K
DIAGNOSTIC D'ESPÈCE AU SEIN DU GROUPE D
(*STREPTOCOCCUS* ET *ENTEROCOCCUS*)

Genre Espèce	<i>Enterococcus</i>				<i>Streptococcus</i>	
	<i>faecalis</i> *	<i>faecium</i>	<i>durans</i>	<i>avium</i>	<i>bovis</i>	<i>equinus</i>
Groupe de Lancefield	D	D	D	DetQ	D	D
Croissance à 45°C	+	+	+	+	+	+
10°C	+	+	+	-	-	-
Résistance au tellurite de K	+	-	-	-	-	-
Hydrolyse arginine	+	+	+	-	-	-
gélatine	V**	-	-	-	-	-
Fermentation sorbitol	+	-	-	+	-	-
glycérol	+	-	-	-	-	-
arabinose	-	+	-	+	i	v n
mannitol	+	+	-	+	+	-
Hydrolyse de l'amidon	-	«	-	-	+	-
Production glucane	-	-	-	-	+	-

* var. *zymogenes* bêta-hémolytique, ** var. *liquefaciens* : gélatine+

Les streptocoques dépourvus d'antigène de groupe sont habituellement appelés *viridans* bien que certains d'entre eux ne soient pas hémolytiques. Ils sont aussi appelés non groupables, mais lors des essais de groupage par la méthode de Lancefield un anneau est parfois observé avec le groupe H, K ou E. Ces streptocoques sont responsables d'environ la moitié des cas d'endocardites lentes. Les caractères permettant de les identifier sont montrés dans le tableau X. Il existe d'autres espèces de streptocoques oraux tels *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. oralis* et récemment *S. vestibularis* (Coykindall, Schleifer).

TABLEAUX
SCHÉMA RÉDUIT D'IDENTIFICATION DES STREPTOCOQUES NON GROUPABLES
(D'après HORODNICEANU ET DELBOS)

	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguis II</i>	<i>S. sanguis I</i>	<i>S. milleri</i>	<i>S. mutons</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. morbillorum</i>
Fermentation des sucres							
Lactose	+	+	+	+	+	+	-
Raffinose		+	var	e	+	+	-
Inuline	-		+	-	+	+	e
Mannitol	-		-	-	+	-	-
Hydrolyse de l'arginine	var	var	+	+	e	-	-
Hydrolyse de l'esculine		-c	+	+	+	+	-
Acétoïne	-e	-e	-	+	var	var	-
Production de dextrane	-e	var	+	-	+	-	-
Production de levane	-		-	-	-	+	-
Croissance sous CO ₂	-e		-	var	var	-	e

(e) : quelques exceptions

L'aspect des colonies sur un milieu gélose saccharose à 5 % permet de reconnaître les souches qui produisent des dextrans ou des levanes, caractère utile au diagnostic. L'emploi d'un bouillon à 5 % de saccharose est intéressant pour le diagnostic de *S. sanguis* qui provoque une gélification du milieu et pour *S. mutons* qui forme un dépôt adhérent aux parois et au fond du tube.

Des streptocoques non groupables, il faut rapprocher les **streptocoques déficients**, également désignés comme : thiol-dépendants, dépendants en vitamine B6 ou pyridoxal. Ces souches cultivent souvent en bouillon alors qu'elles sont incapables de cultiver sur milieu gélose. Il est habituellement possible d'obtenir une culture sur gélose en pratiquant un test de satellitisme. La souche de streptocoque déficient est ensemencée par flottage sur une boîte de gélose au sang, à la manière d'un antibiogramme. Sur cette boîte on effectue ensuite une strie avec une culture de *Staphylococcus aureus*. Le streptocoque déficient se développe au contact de la culture de *S. aureus* dont il utilise les produits de catabolisme qu'il est incapable de synthétiser lui-même. Les récents travaux taxonomiques proposent de distinguer 2 espèces chez les streptocoques déficients : *S. defectius* et *S. adjacens*.

VII - DIAGNOSTIC DIRECT

A - Prélèvements et cultures

1. Hémocultures

Elles sont pratiquées dans un contexte clinique de septicémie ou d'endocardite. On doit pratiquer entre 6 et 10 hémocultures sur 48 heures en utilisant 2 types de flacons : aérobies et anaérobies (coeur-cerveille, Schaedler). L'emploi de milieux enrichis permettant la culture de streptocoques déficients (enrichis en groupements thiols) est parfois utile. Les repiquages doivent être effectués après recherche de trouble ou de microcolonies, avant toute agitation, sur milieux riches en sang, sang cuit en atmosphère CO₂ ou anaérobie. Si la morphologie est évocatrice, on peut cultiver les streptocoques déficients en satellitisme d'une strie de staphylocoque et sur milieux spéciaux. Presque toutes les espèces de streptocoques ou d'entérocoques peuvent être retrouvées. L'interprétation de l'hémoculture avec une seule hémoculture positive contenant un streptocoque non hémolytique est délicate.

2. Liquide céphalo - rachidien

Le streptocoque de groupe B est le plus souvent isolé chez le nouveau-né. Le liquide est en règle purulent, mais la culture peut parfois être positive en l'absence de réaction cellulaire, notamment chez les nouveau-nés. L'ensemencement sur gélose au sang sous CO₂ favorise la croissance. L'isolement dans un LCR d'un entérocoque ou streptocoque non groupable doit être interprété avec prudence, en dehors d'un contexte particulier, ou d'isolements répétés, notamment si l'examen direct est négatif.

3. Urines

Les infections urinaires à streptocoques des groupes D et B ne sont pas exceptionnelles. Les entérocoques sont des contaminants fréquents des urines, aussi la bactériologie quantitative a-t-elle un intérêt tout particulier ; l'isolement nécessite le recours à une gélose au sang.

4. Prélèvements pharyngés

Les prélèvements doivent être pratiqués avec un abaisse-langue, sous contrôle visuel. L'écouvillonnage est effectué au contact des amygdales, de la muqueuse pharyngée et/ou des zones purulentes ou cryptiques.

Si l'écouvillon ne peut pas être placé en milieu de transport ou de survie, il doit être acheminé rapidement après avoir été humidifié préalablement avec du sérum physiologique. La recherche est essentiellement orientée vers les streptocoques bêta-hémolytiques de groupe A. La mise en évidence d'entérocoques ou de streptocoques non groupables est normale, ces bactéries faisant partie de la flore commensale. On peut utiliser des milieux d'enrichissement parallèlement aux milieux sélectifs d'isolement.

5. Prélèvements cutanés

La recherche de streptocoques bêta-hémolytiques non seulement A, mais aussi C et G doit être systématique dans les dermatoses en général, l'érysipèle en particulier, soit par écouvillonnage simple, soit par écouvillonnage au niveau de l'orifice de biopsie. Tous les streptocoques peuvent être retrouvés dans les pus ou collections purulentes, mais les entérocoques et les streptocoques non groupables sont des éléments de la flore cutanée normale et contaminent fréquemment les prélèvements locaux.

6. Prélèvements généraux

Les streptocoques P hémolytiques A et B doivent être recherchés.

7. Prélèvements périphériques

Ils sont surtout pratiqués chez les nouveau-nés, pour apprécier la colonisation néonatale. Les examens systématiques comportent la recherche du streptocoque B dans :

- les frottis amniotiques, frottis de liquide gastrique,
- les frottis placentaires,
- les prélèvements superficiels : anus, yeux, bouche, cutanés...

8. Autres prélèvements

On peut être amené à rechercher les streptocoques dans :

- les valves cardiaques au cours d'interventions post-endocardites, ou d'autopsies,
- les eaux, les aliments pour détecter une contamination fécale (entérocoques).

B - Démarche diagnostique

L'examen direct de certains prélèvements : pus, liquides de ponction, LCR... peut en visualisant des cocci en chaînettes être évocateur de streptocoques. De même cette morphologie observée sur les cultures, et des colonies typiques, jointe à l'observation du type d'hémolyse permet une orientation du diagnostic.

Schématiquement :

1. Si l'on se trouve devant des colonies bêta-hémolytiques, on procède immédiatement à un groupage dans le système de Lancefield, en procédant successivement :

- à une **extraction** de l'antigène de groupe : non plus par la technique classique de Lancefield (extraction HC1), ou à la formamide ou à l'autoclave (réservé à certains groupes D), mais plutôt par technique chimique telle l'extraction nitreuse, ou par extraction enzymatique (pronase B, ou enzyme de *Streptomyces albus*, voire association de cette enzyme avec le lysozyme : à 37°C ou à 45°C durant 30 à 120 minutes selon les recommandations du fabricant).
- à une **mise en évidence de l'antigène de groupe**, assez rarement actuellement par test de précipitation en tube capillaire ou en contreimmunoelectrophorèse, mais plutôt par réaction d'agglutination en mettant en présence l'extrait avec des particules sensibilisées avec des anticorps antigroupes A, B, C, D, F et G fixés soit sur des *Staphylococcus aureus* porteurs de protéine A (coagglutination), soit sur des particules de Latex.

2. Si les colonies ne sont pas bêta-hémolytiques, on peut se trouver en présence d'hémolyses incomplètes ne donnant une hémolyse bêta qu'en présence de toxine staphylococcique (Camp test pour les groupes B). Le plus souvent les colonies alpha-hémolytiques (*viridans*) ou non hémolytiques correspondent à des streptocoques du groupe D ou non groupables. On peut alors procéder à une galerie d'orientation (Tableau IV), voire directement à une galerie d'identification pour arriver au diagnostic d'espèce. On utilise soit des galeries classiques, soit des galeries prêtes à l'emploi (API strep...), complétées par l'étude des caractères cultureux, de la production de dextrans, lévanes, et par la recherche d'antigènes de groupe (extraction à la formamide, à la chaleur) pour le groupe D en particulier, et la recherche des groupes plus rares autres que A, B, C, F, G...

C - Diagnostic antigénique

- L'immunofluorescence a été préconisée sur étalement direct pour la recherche des streptocoques A et B. Cette technique a connu peu de développement en France.
- La recherche d'antigènes de groupe B est intéressante pour le diagnostic des infections néonatales en recherchant les antigènes solubles dans le LCR, le sérum ou les urines. La recherche d'antigènes extractibles directement sur prélèvements génitaux est à l'étude.
- La recherche d'antigènes du groupe A peut être effectuée directement sur prélèvement pharyngé après extraction soit nitreuse, soit enzymatique, par réaction d'agglutination (coagglutination ou Latex) avec des résultats rapides (10 à 30 minutes) ; plus rarement par technique ELISA.

Vffi - DIAGNOSTIC INDIRECT

Les réactifs actuellement commercialisés permettent de doser des anticorps dirigés essentiellement contre les streptocoques de groupe A ; toutefois il existe des réactions croisées avec d'autres streptocoques bêta-hémolytiques.

Les principales toxines et enzymes induisant des anticorps dosables, les propriétés de ces enzymes, le principe de leur dosage et les taux normaux sont regroupés dans le tableau XI.

Remarques concernant cette sérologie :

- il existe chez tout sujet sain un taux variable d'anticorps,
- les seuils considérés comme pathologiques varient assez souvent selon les kits, les fabricants et les unités adoptées,
- *les antistreptolysines O* s'élèvent plus après infection des muqueuses qu'après infection cutanée. Le taux normal ne dépasse pas 100 UI/ml chez l'enfant en âge préscolaire et chez l'adulte 200 UI/ml.

Les sérums hyperlipémiques peuvent donner des taux faussement positifs d'ASLO en raison de la présence de lipoprotéine et de cholestérol, un traitement par le sulfate de dextrane, permet de pallier cette difficulté.

Une élévation significative des ASLO atteint son maximum en 3 à 4 semaines et demande 2 à 4 mois pour revenir à la normale. L'observation d'une élévation du titre a plus d'intérêt que l'observation d'un titre élevé isolé.

Les antistreptodornases B (ADNases B) sont de plus fidèles témoins d'une infection cutanée à streptocoques A que les ASLO : elles sont en effet élevées dans 89 % des cas contre 36 % pour les ASLO. Dans les infections pharyngées, les ASLO tout comme les ANADases sont plus souvent élevées que les ADNases B. Les ASH s'élèvent plutôt dans les infections d'origine cutanée.

Le choix le plus judicieux d'une association est ASLO plus ADNases B qui conduit à 98 % d'efficacité diagnostique. Ainsi les réactions sérologiques les plus utilisées actuellement sont ASLO et ADNases B ; les autres (ANADases, ASH et ASK) sont très peu pratiquées et semblent d'ailleurs d'un intérêt mineur.

Certaines réactions de dépistage par agglutination passive permettent la détection simultanée de plusieurs anticorps, c'est le cas du **Streptozyne[®]**. Le test est considéré comme positif si l'agglutination est observée pour une dilution du sérum supérieure ou égale au 1/100^{ème}. Ce type de test permet un diagnostic préliminaire rapide mais il n'est pas toujours efficace pour la détection des ADNases B.

Le dosage des anticorps dirigés contre le streptocoque de groupe B n'est pas encore pratiqué couramment. Réalisé sur le sérum des futures mères, il aurait

TABLEAU XI
SUBSTANCES ANTIGÉNIQUES ÉLABORÉES PAR LES STREPTOCOQUES DU GROUPE A,
COMMUNAUTÉS ANTIGÉNIQUES, PRINCIPE DU DOSAGE DES ANTICORPS ET SEUILS
DÈS VALEURS PATHOLOGIQUES

ENZYMES	Streptocoques producteurs	Propriétés	Anticorps spécifiques
Streptolysine 0	Groupes A, C, G (nombreuses souches de streptocoques A)	- Toxique cytolytique (érythrocytes...) - Inactivée par l'oxygène - Active sous forme réduite	Antistreptolysine 0 (ASLO)
Désoxyribonucléase ou Streptodomase	Groupe A : toutes les souches plus quelques autres groupes (CG)	Dépolymérise l'ADN	Antidésoxyribonucléase (ADNase) ou Anti-streptodomase B
Streptokinase ou Fibrinolysine	Groupes A, C, G : nombreuses souches Groupes B et F : quelques souches	- Action fibrinolytique (active le plasminogène en plasmine)	Antistreptokinase(ASK)
Hyaluronidase	Groupe A : surtout types 4 et 22 Groupe B, C et G : quelques souches	Hydrolyse l'acide hyaluronique	Antistreptohyaluronidase (ASH)
Nicotinamide-Adénine-Dinucléoridase	Groupe A : certains types (3-4-12) Groupe C et G : quelques souches	Clive le co-enzyme 1 NAD	Antistreptonicotinamide Adéninedinucléotidase (ANADase)

ENZYMES	Dosage par neutralisation	Seuil des valeurs pathologiques
Streptolysine 0	Hémolyse des GR lapin ou homme	≥ 250 U.I.
Désoxyribonucléase ou Streptodomase	Dépolymérisation de l'ADN	S 400 Unités
Streptokinase ou Fibrinolysine	Fibrinolyse	> 150 Christensen
Hyaluronidase	Dépolymérisation de l'acide hyaluronique	> 15 000 unités turbidimétriques
Nicotinamide-Adénine-Dinucléodase	Scission du NAD	≥ 150 U Kellner

l'intérêt de prévoir quels sont les nouveau-nés bénéficiant d'une protection d'origine maternelle par transmission transplacentaire d'anticorps.

Grâce à l'obtention de certains antigènes streptococciques purifiées, il a été possible de réaliser, seulement à titre de recherche, des sérodiagnostics dans un contexte d'endocardite (à *E. faecalis* notamment) ou d'immunoprophylaxie dans les infections néonatales à streptocoque du groupe B chez les femmes enceintes.

IX - TRAITEMENT

A - Préventif:

- la vaccination contre les streptocoques de groupe B fait l'objet de recherches ; de même contre le groupe A des études utilisant comme antigène vaccinant des protéines M sont en cours.
- la prévention des caries par vaccination est également envisagée.

L'antibioprophylaxie est recommandée pour prévenir les endocardites consécutives à des extractions dentaires et pour éviter les complications post-streptococciques.

B - Curatif ; Sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont longtemps restées sensibles à la plupart des antibiotiques. L'apparition depuis quelques années de souches résistantes aux antibiotiques classiquement utilisés tels que les pénicillines, les macrolides et apparentés (2 % de résistances pour le groupe A 6 à 18 % pour le groupe B et 47 % pour *E. faecalis*), le chloramphénicol et les cyclines, oblige à une surveillance attentive de ces résistances, tant dans une perspective épidémiologique que curative.

1. Méthodes d'étude

al L'antibiogramme classique

Il est effectué en utilisant un milieu de Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang et un inoculum obtenu par dilution d'une culture en bouillon, inoculum lourd (groupes A,C,F et G), léger (groupes B et D) ou intermédiaire (non groupables). Une incubation de 18 heures à 37°C en atmosphère de CO₂, est réalisée.

bl Détermination du niveau de résistance aux aminosides

Deux techniques peuvent être utilisées :

- soit une technique de diffusion avec des disques chargés à 250 µg pour la gentamicine et 500 p.g pour la streptomycine. Les résistances à haut niveau donnent un diamètre inférieur à respectivement 10 et 12 mm, à bas niveau supérieur respectivement à 14 et 18 mm.
- soit une gélose coeur-cerveau avec 5 % de sérum de cheval dans laquelle on a incorporé une concentration finale de 1 000 et 2 000 mg/l de l'aminoside à étudier. Une souche qui se développe sur le milieu a une résistance à haut niveau à l'aminoside considéré.

cl Détection de la tolérance

Pour les streptocoques considérés comme limites ou résistants à la Pénicilline, ou pour les entérocoques, il peut être nécessaire (endocardites notamment) de

déterminer la CMI et la CMB en milieu liquide. On peut ainsi déceler les souches « tolérantes » à la Pénicilline c'est-à-dire pour lesquelles le rapport CMI/CMB est supérieur à 32. Les souches réellement résistantes s'observent surtout parmi les streptocoques non groupables et les entérocoques.

Une méthode simple de détection de la tolérance peut être faite sur la boîte d'antibiogramme. Elle consiste, après lecture de l'antibiogramme, à placer dans la zone d'inhibition de la pénicilline un disque contenant une bêta-lactamase. Après une nouvelle incubation de 18 heures, la croissance de la bactérie dans la zone d'inhibition, là où la bêta-lactamase a détruit la pénicilline, signifie que la pénicilline n'a pas eu une action létale sur la souche.



FIGURES
DÉTECTION RAPIDE DE LA TOLÉRANCE.
 (Pase = disque de pénicillinase, PEN = disque de pénicilline)

Détection rapide de la tolérance. Pase = disque de pénicillinase PEN = disque de pénicilline

2. État actuel de la sensibilité des streptocoques

Les streptocoques sont généralement sensibles aux pénicillines et aux macrolides. Ils sont résistants aux polymyxines et souvent aux quinolones. Il existe une résistance naturelle aux aminosides qui sont inactifs seuls, mais ont souvent une action synergique avec les pénicillines. D'une façon générale les céphalosporines sont moins actives que les pénicillines. Les streptocoques ont un comportement vis-à-vis des antibiotiques qui diffère selon les espèces. D'une façon générale, les entérocoques sont plus résistants.

al Streptocoques du groupe A

Toutes les souches de streptocoques du groupe A sont sensibles à la pénicilline G. La CMI est située entre 0,005 mg/1 et 0,02 mg/1. La pénicilline G est l'antibiotique de choix pour la prophylaxie et le traitement des infections à streptocoque du groupe A.

Les macrolides et apparentés sont les antibiotiques à utiliser en cas d'allergie à la pénicilline G. Les souches résistantes à ces antibiotiques sont exceptionnelles en France, alors que cette résistance est fréquente dans d'autres pays.

Les cyclines ont une activité variable selon les souches. Le pourcentage de streptocoques du groupe A résistant à ces antibiotiques est situé entre 20 et 30 %.

bl Streptocoques du groupe B

Cette espèce est légèrement moins sensible à la pénicilline G que le groupe A. La CMI de 50 % des souches se situe à 0,03 mg/1. Ces souches sont donc quand même bien accessibles à un traitement par les pénicillines.

Les macrolides et apparentés sont actifs dans la majorité des cas, mais environ 5 % des souches sont résistantes à ces produits.

En ce qui concerne l'action des cyclines on observe deux populations : 80 % des souches sont résistantes aux cyclines ; les autres sont sensibles.

cl Streptocoques du groupe D

Les entérocoques (*E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans*) sont relativement plus résistants aux antibiotiques. Or, pour traiter les endocardites il est indispensable d'avoir un traitement bactéricide.

Les pénicillines sont moins actives vis-à-vis des entérocoques que vis-à-vis des autres streptocoques. La CMI de la pénicilline G comme celle de l'ampicilline se situe entre 1 et 8 mg/l. Les souches de *E. faecium* sont les plus résistantes.

Au cours des endocardites, une activité bactéricide est obtenue en associant une forte dose de pénicilline à un aminoside.

La CMI de la streptomycine vis-à-vis des entérocoques est généralement comprise entre 25 et 100 mg/l. Cette résistance de bas niveau à la streptomycine permet à cet antibiotique d'avoir une action synergique avec la pénicilline. Dans un certain nombre de cas, qui peut atteindre 20 % avec *E. faecalis*, il existe un haut niveau de résistance aux aminosides expliqué par l'acquisition d'une enzyme modificatrice voisine de celle détectée chez *S. aureus* (plutôt que par une mutation chromosomique rare). Pour ces souches, la CMI de la streptomycine est très élevée, elle est toujours nettement supérieure à 1 000 mg/l. On n'observe plus d'activité synergique de l'association pénicilline et streptomycine.

L'association de la pénicilline avec un autre aminoside demeure, en règle générale, synergique vis-à-vis de ces souches. Cependant, des souches de *E. faecalis* hautement résistantes à la gentamicine ont été décrites. En pratique, avant les résultats des examens de laboratoire, l'association pénicilline et gentamicine est souvent préférable à l'association classique pénicilline et streptomycine.

Si l'association pénicilline et aminoside n'est pas utilisable, un traitement bactéricide est souvent obtenu en associant l'érythromycine et une cycline. L'action bactéricide de cette association sur la souche d'entérocoque à traiter doit être vérifiée au laboratoire.

En l'absence de possibilité d'utiliser ces deux types d'association, il reste à employer un traitement comportant de la vancomycine ou la teicoplanine voire la rifampicine.

Quant à *S. bovis*, sa sensibilité aux antibiotiques le rapproche des streptocoques dits *viridans* bien que quelques souches hautement résistantes aux aminosides aient été observées.

dl Streptocoques viridans

Les streptocoques *viridans* ont un pouvoir pathogène limité en dehors des endocardites. Leur sensibilité à la pénicilline G est bonne. Les CMI sont comprises entre 0,06 et 0,5 mg/l. Aussi, il a été proposé des traitements utilisant la pénicilline seule. Il semble difficile d'établir des attitudes rigides en matière de traitement des endocardites à streptocoques. Considérant la gravité de la maladie, toute souche de streptocoque isolée au cours d'une endocardite doit faire l'objet d'une étude complète de sa sensibilité aux antibiotiques, même si elle appartient à une espèce réputée sensible. De plus la recherche d'associations d'antibiotiques bactéricides et synergiques *in vitro* est absolument nécessaire. En effet, au sein d'espèces sensibles quelques souches ont parfois une résistance inhabituelle.

➤ 3. Surveillance du traitement d'une endocardite

Les examens de laboratoire permettent d'apprécier si le traitement antibiotique est bactéricide et bien adapté. Ces examens sont :

- la recherche de la négativation des hémocultures ;
- le dosage des antibiotiques pour avoir des taux efficaces, **mais non** toxiques (aminosides, vancomycine, teicoplanine) ;
- l'étude du rapport efficace, taux sérique/CMI ou CMB ;
- la détermination du pouvoir bactéricide du sérum (PBS). Il est satisfaisant si une dilution au moins égale au 1/16^e laisse un nombre de bactéries survivantes inférieur ou égal à 1% des bactéries ensemencées (la standardisation de cette technique pose toujours un problème).

BIBLIOGRAPHIE

- AVRIL J.L., PLAISANCE J.J., « Caractères culturaux et biochimiques des streptocoques. État actuel de la sensibilité aux antibiotiques », *Méd. Mal. Infect.* 1980, **10**, 627-632.
- BOHACH G.A., FAST D.J., NELSON R.D., SCHLIEVERT P.M., « Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses ». *Cru. Rev. Microbiol.*, 1990, **17**, 251-272.
- BOUVET A., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D., *Streptococcus defectivus* sp. nov. and *Streptococcus adjacens* sp. nov. nutritionally variant streptococci from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1989, **39**, 290-294.
- CALDERWOOD S.A., WENNERSTER C., MOELLERING R.C., KUNTZ L.J., KROGSTAD D.J., « Résistance to six aminoglycosidic aminocyclitol antibiotics among enterococci : prevalence, évolution and relationship to synergism with penicillin ». *Antimicrob. Agents Chemother.* 1977, **12**, 401-405.
- COYDENDALL A.L., « Classification and identification of thé viridans streptococci », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, **2**, 315-328.
- DELMAS P., FREYNEY J., « Les Streptocoques », *Lyon Méd.*, 1989, **40**, 353-369.
- ÉTIENNE J., REVERDY M.E., MOUREN C., FLEURETTE J., « Étude bactériologique de cent vingt cinq endocardites infectieuses à streptocoque », *Path. Biol.*, 1982, **30**, 707-710.
- FACKLAM R.R., PADULA J.F., THACKER L.G., WORTHAM E.C., SCONYERS B.J., « Presumptive identification of group A, B and D Streptococci », *Appl. Microbiol.*, 1974, **27**, 107-113.
- FACKLAM R.R., « Physiological différenciation of viridans Streptococci », *J. Clin. Microbiol.*, 1977, **5**, 184-201.
- FISCHETTI V.A., « Streptococcal M protein : molecular design and biological behavior », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, **2**, 285-314.
- HORODNIÇEANU T., DELBOS F., CHABBERT Y.A., « Caractéristiques des souches de *Streptococcus mutans* isolées d'endocardites subaiguës et sensibilité aux antibiotiques », *Ann. Microbiol.*, (Inst. Pasteur), 1977, **128 A**, 205-216.
- HORODNIÇEANU T., BOURGUELERET L., ELSOLH N., BIETH G., DELBOS F., « High-Level plasmid-borne résistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* », *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, **16**, 686-689.
- HORODNIÇEANU T., DELBOS F., « Group D streptococci in human infections : identification and sensibility to antibiotics », *Ann. Microbiol.*, (Inst. Pasteur), 1980, **131 B**, 131-155.
- MOELLERING R.C., KORZENIOWSKI O.M., SANDE M.A., WENNERSTEN C.B., « Species-specific résistance to antimicrobial synergism in *Streptococcus faecium*, and *Streptococcus faecalis* », *J. Infect. Dis.*, 1979, **140**, 203-209.
- ROTTA J., « Some aspects on streptococci and streptococcal disease », *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*, 1982, **15**, 313-334.
- RUOFF K.L., « Récent taxonomic changes in thé genus *Enterococcus* », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, **9**, 75-79.
- SCHEFTEL J.M., LAPLANCHE G., FREYDIERE M.-H., GROSSHANS E., « Etude de la détermination simultanée des antistreptolysines O et des antistreptodomasés B au cours des infections streptococciques cutanées », *Ann. Dermatol. Venereol.* (Paris), 1982, **109**, 1031-1036.
- SCHEIFER K.H., KILPPER-BALZ R., « Molecular and chemotaxonomic approaches to thé classification of streptococci, enterococci and lactococci : a review », *System. Appl. Microbiol.*, 1987, **10**, 1-19.
- WANNAMAKER L.W., « Streptococcal toxins », *Rev. Infect. Dis.*, 1983, **Suppl 4**, S723-S732.

ANNEXE

Autres cocci à Gram positif

Genre *Aerococcus*

Aerococcus viridans

Il s'agit de cocci à Gram positif, disposés en tétrades ou en amas. Sur gélose au sang, les colonies sont entourées d'une hémolyse verdâtre. *A. viridans* se distingue des streptocoques et des staphylocoques par le type respiratoire microaérophile. La catalase est variable.

Longtemps considéré comme un simple aérocontaminant, *A. viridans* se comporte parfois comme un opportuniste responsable d'infections hospitalières chez des malades fragilisés. Les causes favorisantes sont : diabète, immunodépresseurs, éthylisme et stase vésicale.

Peu sensible à la pénicilline **G**, *A. viridans* est très sensible à l'ampicilline, aux céphalosporines et au triméthoprime. La sensibilité à la gentamicine est faible.

BRAUER C., MONTEIL H., « *Aerococcus viridans*, bactérie opportuniste en milieu hospitalier », *Méd. Mal. Infect.*, 1983, **13**, 283-286.

Genre *Gemella*

Deux espèces sont décrites : *G. haemolysans* et *G. morbillorum*.

\ L'espèce type *Gemella haemolysans* a été isolée dans des cas d'endocardite infectieuse. On la trouve également dans le tractus respiratoire supérieur, les yeux et l'intestin. Il s'agit de bactéries anaérobies, immobiles, pouvant apparaître Gram (-), isolées ou groupées en paires ou courtes chaînettes. Elles sont catalase (-) et oxydase (-). *G. haemolysans* crée une hémolyse des érythrocytes de lapin ou de cheval. Cette bactérie est bien sensible aux antibiotiques usuels sauf aux aminosides et aux sulfamides. «

CHATELAIN R., CROIZE J., ROUGE P., et al. « Isolement de *Gemella haemolysans* dans 3 cas d'endocardite bactérienne », *Méd. Mal. Infect.*, 1982, **12**, 25-30.

Genres *Leuconostoc* - *Pediococcus*

Les genres *Leuconostoc* et *Pediococcus* sont caractérisés par une résistance de haut niveau à la vancomycine (> 512 µg/ml). *Leuconostoc* peut se comporter comme un pathogène opportuniste et *Pediococcus* peut être sélectionné et isolé notamment dans les selles chez des sujets subissant une antibiothérapie lourde. Quelques caractères d'orientation permettent de distinguer ces genres (tableau I).

EDLINGER, C., PETIT, J.C., Bactéries à Gram positif, catalase-négatives résistantes à la vancomycine. La lettre de l'infectiologue, 1990, 5, 655-664.

TABLEAU 1
 CARACTERES D'ORIENTATION PERMETTANT DE DISTINGUER LES GENRES
ENTEROCOCCUS, *PEDIOCOCCUS*, *LEUCONOSTOC*,
LACTOBACILLUS ET *STREPTOCOCCUS*

	<i>Enterococcus</i>	<i>Pedococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
Vancomycine	S(1 %R)	R	R	R/S	S
Gaz			+	+	
PYR*	+				.a
LAP**	+	+		d	+

* PYR : Pyroglutamate - naphthylamidase

** LAP : Leucine aminopeptidase

a: Seul *S.pyogenes* est +

Genre *Stomatococcus*

Stomatococcus mucilaginosus

Stomatococcus mucilaginosus est isolé dans près de 10 % des prélèvements bucco-pharyngésensemencés sur gélose au sang. Ce germe, souvent méconnu, hôte saprophyte de la gorge et de la bouche, est parfois responsable d'infections opportunistes ou de bactériennes transitoires. C'est pourquoi les principaux caractères d'identification de ce germe ne doivent pas être ignorés : il s'agit de cocci à Gram positif en amas, produisant un abondant matériel capsulaire, ayant une activité catalasique faible ou nulle, réduisant les nitrates en nitrites, hydrolysant l'esculine et la gélatine et produisant de l'acétoïne. Ces bactéries croissent sur gélose au sang ou sur milieu columbia, mais pas en présence de 5 % de NaCl. Elles forment des colonies blanches, non hémolytiques et adhérant à la gélose.

HADOU T., LOMBARD C., PIEMONT Y., PREVOST G., « *Stomatococcus mucilaginosus* : une bactérie souvent méconnue mais fréquemment rencontrée », *Méd. Mal. Infect.*, 1990,**20**,490-492.

Chapitre ffl

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

HISTORIQUE

Isolé de la salive en 1880 par Pasteur, *S. pneumoniae* reste, malgré sa sensibilité aux antibiotiques, à la première place parmi les causes de mortalité par maladie infectieuse dans les pays développés. La découverte en 1910 des différents types sérologiques de *S. pneumoniae* avait permis l'emploi d'antisérums spécifiques qui furent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque. L'étude de la physiologie de cette bactérie a conduit à des découvertes capitales qui ont ouvert la voie à la biologie moléculaire. En 1928, Griffith a montré qu'une souche R (rough) non capsulée et non pathogène pour la souris de *S. pneumoniae* pouvait être transformée en une souche S (smooth), capsulée et pathogène. En 1944, Avery, MacLeod et MacCarthy établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques.

I - HABITAT

Le pneumocoque colonise fréquemment les voies respiratoires de l'homme puisqu'il y aurait jusqu'à 70 % de porteurs pharyngés sains ; on peut parfois le retrouver au niveau des muqueuses génitales.

C'est un germe transmis par voie aérienne : la transmission est presque toujours directe par l'intermédiaire des gouttelettes de Pflügge. Le germe, réputé **fragile**, survit peu dans le milieu extérieur.

C'est un germe essentiellement humain, il est très rarement isolé chez les animaux.

II - PHYSIOPATHOLOGIE

Les découvertes de ces dernières années éclairent certains faits observés en pathologie infectieuse, mais ne règlent pas tout. Pendant longtemps, on a pensé que la **capsule** était responsable du pouvoir pathogène (Avery : pouvoir pathogène expérimental sur la souris). La souche S capsulée tuait la souris, la souche R non capsulée était inoffensive. Ce n'est plus tout à fait exact : on peut avoir deux souches capsulées du sérotype 3 qui ont la même composition chimique du polysaccharide, l'une virulente, l'autre non virulente pour la souris ; la capsule n'est donc pas le seul support de virulence.

La capsule protège *S. pneumoniae* de la phagocytose.

L'évolution de la maladie est liée directement aux taux d'antigènes capsulaires circulants et à l'absence d'anticorps ; on sait que dans les infections à pneumocoques la voie alterne du complément est activée et que les acides teichoïques de la paroi provoqueraient un clivage du C3 en sous unités C3a et C3b ; il en résulterait une baisse du taux de C3 et du facteur B. L'une des conséquences serait une coagulation vasculaire disséminée.

Une agrégation des polynucléaires neutrophiles peut s'observer, elle est liée à une altération des membranes de ceux-ci probablement sous l'influence de la pneumolysine. Cette altération des polynucléaires entraîne une leucostase dans les capillaires pulmonaires responsable d'hypoxie et de décompensation cardio-respiratoire.

Leucopénie et cytopénie rachidiennes sont de mauvais pronostic dans les infections à pneumocoque.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Expérimental

La souris est l'animal de choix, l'inoculation intrapéritonéale de pneumocoques capsulés entraîne la mort de la souris. A l'autopsie on observe des germes capsulés dans le sang et sur les empreintes d'organes (foie...). Cette inoculation a été utilisée pour isoler les germes à partir des produits pathologiques et pour identifier des souches isolées.

On utilise de moins en moins cette inoculation à la souris. Ce pouvoir pathogène pour la souris n'est pas constant, certains sérotypes (tel le 14) sont peu pathogènes, de même que les souches en phase R.

B - Naturel

Les infections à pneumocoques peuvent atteindre des sujets jusque-là en bonne santé ; mais elles sont plus fréquentes et plus graves chez les patients présentant certains terrains immunologiques (agammaglobulinémie, splénectomie, traitements immunodépresseurs), mais aussi chez des patients à l'immunité perturbée tels que drépanocytaires, sujets âgés...

La mortalité croît avec l'âge, le retard à l'hospitalisation, l'**existence** de tares associées (diabète, aplasie, cirrhose, néphrite, cancers...)...

Les localisations les plus fréquentes sont *ORL*, surtout chez l'enfant à type d'otites **ou** de sinusites ; elles peuvent constituer des portes d'entrée pour des infections plus **graves**.

1. *La pneumonie franche lobaire aiguë*

Elle est très fébrile, s'accompagne d'un point de côté thoracique avec crachats rouilles et signes de condensation pulmonaire ; à côté de ce tableau classique le pneumocoque intervient dans les surinfections pulmonaires post-virales (grippe par exemple). Dans les pneumopathies la mortalité moyenne est de 20 % ; cette mortalité est plus élevée lorsque les hémocultures sont positives.

2. *Les méningites à pneumocoques*

Elles surviennent à tout âge mais surtout chez le nourrisson et le vieillard. Elles sont primitives ou secondaires à un foyer ORL ou à un traumatisme crânien ; elles sont

caractérisées (en dehors des signes classiques de méningites purulentes) par un début brutal foudroyant, des troubles neuro-végétatifs sévères, un syndrome méningé franc. Le pronostic est sévère, la mortalité est de l'ordre de 30 %.

3. Les autres localisations

Elles ne doivent pas être méconnues, même si elles sont rares :

- péritonites
- gangrènes cutanées
- endocardites, arthrites
- infections génitales...

LE PNEUMOCOQUE EN CHIFFRES
Il est responsable en France de : <ul style="list-style-type: none"> - 50 % des otites - 50 % des pneumopathies bactériennes - 20 % des méningites bactériennes - 10 à 15 % des septicémies
En Europe il provoque : par an 800 infections/100 000 habitants dont 500 otites 300 pneumonies 1,5 méningites avec 20 décès/100 000 habitants par an.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

À l'examen microscopique, le pneumocoque a un aspect en diplocoque, en flamme de bougie, en 8 et en courtes chaînettes.

Les diplocoques et les chaînettes capsulées sont à Gram positif.

Cependant, il faut savoir que l'aspect n'est pas toujours aussi évocateur. Par exemple, si l'environnement est carence en magnésium, on peut observer des chaînettes relativement longues. Le même phénomène se produit en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire. Dans certains cas, si le malade est sous traitement, on peut voir des pneumocoques prendre des formes pseudobacillaires.

Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître à Gram négatif. Particulièrement belle après inoculation à la souris, la capsule est généralement visible dans les produits pathologiques, mais parfois plus discrète (Fig. 1, 2). La capsule est plus visible sur une préparation à l'encre de Chine.

La synthèse de la capsule varie selon le stade de la courbe de croissance du germe. La synthèse capsulaire est optimale en fin de phase exponentielle et dans la phase de plateau. Quand les pneumocoques se multiplient intensément, on distingue mal les capsules ; ces polysaccharides capsulaires sont relargués dans le milieu, ils sont aussi libérés dans les produits pathologiques, d'où le terme d'exoantigènes solubles parfois utilisé pour les désigner.

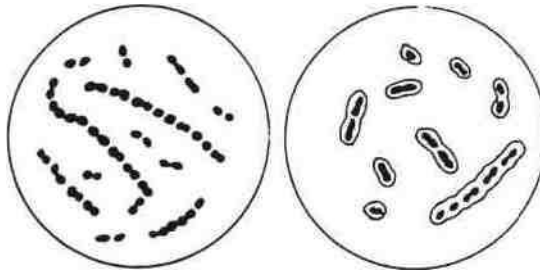


FIGURE 1

FIGURE 2

B - Caractères cultureux

L'intervalle de température permettant la culture va de 25 à 42°C. En routine, on cultive le germe entre 35 et 37°C. Les cultures sont possibles pour des pH situés entre 6,5 et 8,3, le pH optimal étant de 7,8. Les pneumocoques en culture sont sujets à une **autolyse** spontanée ; il conviendra donc de chercher à limiter cette autolyse.

Les milieux employés seront riches, par exemple gélose + sang de mouton à 5 %. Sur ce milieu, le germe développe une hémolyse de type alpha, comme ses proches parents, les streptocoques verdissants. Certaines souches exigent du CO₂ en primo-culture.

L'anaérobiose stricte est encore meilleure pour leur développement et on peut considérer que la gélose au sang placée en anaérobiose est un milieu sélectif qui favorise le pneumocoque.

A l'examen macroscopique, les colonies se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre.

Une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse.

Le sérotype III présente des colonies muqueuses d'un diamètre de 3 mm, semblables à celles des *Klebsiella*. Cet aspect muqueux est dû à l'exubérance des capsules.

Dans les conditions d'anaérobiose stricte, les colonies sont bombées et de taille 2 à 3 fois supérieure à celles observées en aérobie, et l'hémolyse n'apparaît pas. Par contre, si on abandonne la boîte 30 mn en atmosphère normale, une hémolyse alpha apparaîtra. En anaérobiose, en présence d'antibiotiques modifiant la paroi (pénicilline, vancomycine), il apparaît une hémolyse bêta (voir photo).

C - Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable en partie de son autolyse. Les autres caractères sont :

- . nitrate : —
- . gélatine : —
- . lait toumesolé : acidifié et coagulé,
- . fermentation des sucres : acidification du glucose, du lactose, du raffinose, du saccharose...

Deux caractères sont plus intéressants :

- . esculine : —
- . inuline : —

Ces caractères ne sont guère recherchés pour l'identification du germe. L'inuline, par contre, a servi à différencier le pneumocoque des autres streptocoques, mais un certain nombre de streptocoques verdissants peuvent fermenter aussi l'inuline : *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus uberis*.

L'identification formelle de pneumocoque repose sur trois critères :

- la sensibilité à l'optochine, et en cas de doute :
- la lyse par la bile,
- la mise en évidence d'une capsule.

1. Sensibilité à l'optochine (éthylhydrocupréine, dérivé proche de la quinine)

Des disques de 5 mm de diamètre sont chargés de 5 µg d'optochine, dose calculée pour provoquer, sur une culture de pneumocoques sur gélose au sang, une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 12 et 35 mm. On peut lire sur les notices des fabricants que les streptocoques, par contre, sont résistants à l'optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque. Cette distinction n'est pas toujours aussi évidente. En fait, 0,5 à 5 % des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques streptocoques verdissants sont inhibés par l'optochine. Il convient donc d'être nuancé et de tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition : la plupart des pneumocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont une zone de diamètre supérieure à 15-20 mm. Pour un diamètre inférieur à 15 mm, il est nécessaire de pratiquer des tests complémentaires.

2. La lyse par la bile ou phénomène de Neufeld

On procède à une culture en bouillon et on centrifuge. Les germes sont remis en suspension dans un tampon à pH 7 et on ajoute quelques gouttes de solution de désoxycholate de Na de 2 à 10 % ; en quelques minutes, le tube s'éclaircit. Les sels biliaires activent l'autolysine des pneumocoques.

3. Mise en évidence de la capsule

Il faut disposer d'un sérum antipneumococcique polyvalent, dirigé contre tous les types capsulaires. La réaction peut s'effectuer soit à partir des cultures, soit à partir des produits pathologiques.

L'antigène capsulaire peut-être révélé par "gonflement" capsulaire si les cocci sont visibles, soit par technique immunologique telle que contre-immuno- électrophorèse (Cffi) ou technique d'agglutination.

D - Les antigènes pneumococciques

1. Les antigènes capsulaires

Ils peuvent être mis en évidence par gonflement capsulaire, contre-immuno-électrophorèse ou agglutination. La composition chimique de certains sérotypes est bien connue.

Dès 1913, on reconnaissait 4 sérotypes. En 1939, on en avait découvert 32. Puis les recherches sur la mise au point d'un vaccin ont relancé l'intérêt pour les sérotypes et deux nomenclatures ont été proposées, l'une américaine, l'autre danoise. C'est la classification danoise de Lund qui a prévalu ; elle recouvrait 83 groupes ou types capsulaires différents. Elle comprend 27 antigènes de type et 19 groupes contenant au total 56 antigènes de type.

Le Statens Serum Institut de Copenhague produit un omnisérum et 9 sérums pools de A à I et 46 sérums monovalents. La détermination du type ou du groupe complète l'identification de la souche.

Les pneumocoques possèdent des antigènes autres que ces antigènes polysaccharidiques capsulaires.

2. Les antigènes somatiques

La substance C, spécifique d'espèce, qui est un polysaccharide constitué d'acide teichoïque, peut parfois contaminer les polysaccharides capsulaires et peut être responsable de réactions croisées. Sa composition chimique est analogue au polysaccharide C des streptocoques mais elle est différente du point de vue antigénique.

L'antigène **R**, de nature protéique, est souvent inapparent, car masqué par l'antigène capsulaire.

L'**antigène M** est un antigène de nature protéique spécifique de type assez proche de l'antigène M des streptocoques du groupe A.

E - Les toxines

A côté de ces antigènes capsulaires et somatiques, le pneumocoque élabore des **toxines** dont la plupart sont également antigéniques : la pneumolysine, la neuraminidase, la hyaluronidase, le principe producteur de purpura.

1. La pneumolysine

Responsable de l'hémolyse de type alpha, c'est une toxine oxygène sensible, activée par les groupements thiols, sensible au cholestérol, cytolytique, au même titre que la streptolysine 0. Elle semble très liée au corps bactérien et est à localisation intra-cytoplasmique.

La pneumolysine a été purifiée, elle a un PM de 35 kDa ; par ailleurs son gène a été cloné et séquencé.

Elle lyse les hématies de lapin, de cobaye et les hématies humaines ; elle lyse également des globules blancs. Son effet comme leucocidine est connu depuis longtemps : les méningites purulentes les plus graves ont une cytorachie faible. Elle détruit également les plaquettes et son effet toxique s'exerce sur d'autres cellules, en particulier celles de l'œil.

Elle présente un seul type antigénique et est transformable en anatoxine, d'où des applications possibles.

2. La neuraminidase

De nombreuses souches à l'isolement sont productrices de cette toxine qui a pour cible les acides sialiques.

Purifiée et injectée par voie intra-péritonéale à la souris, elle provoque des lésions hépatiques et rénales et, par voie intra-cérébrale, entraîne des symptômes neurologiques.

3. La hyaluronidase

Elle peut jouer un rôle au point de vue pathogénique, mais probablement moindre que celui joué par les deux précédentes toxines.

4. Le principe producteur de purpura (PPP)

Il est connu depuis 1926, mais en 1981, on a montré qu'une enzyme intervenait, soit dans la genèse, soit dans la libération de ce principe : il s'agit de la N-acétylmuramyl-1-alanine-amidase. Cette substance n'est pas antigénique, mais pourrait reproduire soit le purpura, soit des hémorragies internes.

«

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DES INFECTIONS PNEUMOCOCCIQUES

A - Diagnostic direct

L'isolement du germe est en général facile en l'absence de traitement préalable.

7. Les prélèvements

Les différents échantillons à prélever pour porter un diagnostic de méningite, septicémie ou pneumopathie à pneumocoques figurent dans le tableau I.

TABLEAU
PRÉLÈVEMENTS A EFFECTUER DANS LES PRINCIPALES INFECTIONS PNEUMOCOCCIQUES.

	MÉNINGITE	SEPTICÉMIE	PNEUMOPATHIE
Examen direct	LCR après centrifugation prolongée	-	Crachat Liquide pleural
Cultures sur gélose au sang en atmosphère de CO ₂ ou de préférence en anaérobiose	LCR et Sang	Sang	Crachat, aspirations bronchiques, ponctions transtrachéales, Sang, Liquide pleural
Recherche d'antigènes (à discuter)	LCR Sérum Urines	Hémocultures Sérum Urines	Crachat Sérum Urines Liquide pleural

al *Les sécrétions trachéo-bronchiques*

Les crachats sont fréquemment contaminés par des pneumocoques pharyngés. Les ponctions trans-trachéales et les aspirations protégées ont nettement amélioré la qualité du prélèvement donné au bactériologiste.

L'examen direct est primordial. Il faut en effet, noter l'abondance du germe et la cytologie. On a proposé de faire une bactériologie quantitative pour différencier les pneumocoques de la cavité pharyngée et ceux de l'arbre respiratoire, mais l'interprétation n'est pas toujours aisée.

En plus de ces prélèvements, il faut effectuer des hémocultures lors des pneumopathies aiguës.

bl *Les hémocultures*

Elles sont malheureusement trop souvent négligées au cours des pneumopathies, alors qu'elles permettent, dans ce contexte, de porter un diagnostic étiologique formel (quand elles sont positives).

La bactériémie au cours des pneumopathies est parfois tellement massive **que** l'examen de frottis sanguins peut révéler la présence de pneumocoques.

Les hémocultures poussent rapidement ; dans 85 % des cas elles sont positives dès le deuxième jour, il est recommandé de repiquer rapidement les flacons pour éviter l'autolyse des germes. Quand on soupçonne un pneumocoque on peut centrifuger le bouillon (10 mn à 2 000 rpm) et pratiquer une recherche d'antigènes solubles sur le surnageant (Slidex-Pneumo-Kit).

cl Les liquides de ponction

- **LCR :** le transport du LCR doit se faire rapidement et au chaud. Dans les méningites à pneumocoque il existe souvent une leucocytorachie importante, et l'examen direct est souvent positif puisque le nombre de germes va de 3.10^5 à 5.10^7 UFC/ml selon les auteurs et les pays. Une forte densité microbienne combinée à une cytorachie faible sont de mauvais pronostic.
- Liquides pleuraux : l'examen direct est parfois évocateur.
- Liquides péritonéaux, liquides articulaires peuvent permettre l'isolement de ce **germe**.

dl Pus et prélèvements divers

Le pneumocoque est souvent à l'origine d'otites, de sinusites, il peut être retrouvé à partir de divers pus et même de prélèvements génitaux (urétraux, vaginaux...).

2. La culture

Elle peut facilement être obtenue soit par ensemencement de milieux liquides (bouillons), soit de milieux solides (gélose au sang) rendus sélectifs par l'addition de gentamicine ou d'acide nalidixique. Ces milieux sont placés en atmosphère de CO_2 ou en anaérobiose ; certaines souches sont même anaérobies strictes à l'isolement. Les primocultures sont parfois lentes et peuvent demander 48 heures à $37^\circ C$.

L'identification des colonies (le plus souvent plates voire ombiliquées, plus rarement muqueuses - sérotype 3 - classiquement alpha-hémolytiques mais qui donnent une hémolyse bêta en anaérobiose en présence de vancomycine), se fera grâce à l'épreuve à l'optochine et à la lyse par la bile, ainsi que par la caractérisation des antigènes capsulaires (CIE ou agglutination).

3. La recherche des antigènes solubles

Elle peut se faire sur produits pathologiques (LCR, sérum, urines, liquides pleuraux, pus...) soit directement (CIE), soit après traitement préalable pour les réactions d'agglutination : chauffage 3 mn à $100^\circ C$ pour LCR et urines, soit décomplémentation (30 mn à $56^\circ C$) pour le sérum ; en agglutination on ne tient compte que des agglutinations nettes car les particules étant très chargées (83 sérotypes) ont une légère tendance à l'auto-agglutination. Un kit de diagnostic permettant la recherche des antigènes pneumococciques par technique ELISA vient d'être commercialisé. Il faut noter que :

- certains sérotypes non chargés électriquement ne peuvent pas être détectés en CIE.
- il existe des **communautés** antigéniques entre *S. pneumoniae* et les streptocoques **de** groupe C.
- on peut sérotyper directement les souches sur le produit pathologique par l'étude du gonflement capsulaire, CIE ou agglutination, en utilisant successivement les sérums pools puis monovalents.

Cette sérotypie réalisée sur souche ou sur produit pathologique a un intérêt épidémiologique évident.

B - La sérologie

Elle pourrait constituer un moyen de diagnostic des infections pneumococciques, mais rétrospectif. Elle connaît un regain d'intérêt car elle permet de voir comment un sujet répond à une infection à pneumocoque ou comment il va réagir à la vaccination antipneumococcique. En pratique, elle est réservée à des travaux de recherche.

Elle consiste à doser :

- les anticorps anti-enzymes : anti-pneumolysines, anti-hyaluronidases,
- les anticorps anti-capsulaires : mais le dosage des anticorps anti-polysaccharidiques est difficile (83 sérotypes différents).

Pour le dosage de ces anticorps, on dispose de techniques anciennes :

- réactions d'agglutination,
- réactions de gonflement de la capsule,
- réactions de précipitation par électro-immuno-diffusion, qui sont remplacées par deux techniques qui ont les mêmes performances :
- la technique radioimmunologique (RIA) a servi de méthode de référence pendant la durée de la mise au point du vaccin,
- la technique ELISA a fait l'objet de nombreux travaux.

En pratique on a recours à deux approches différentes : dosage des anticorps antipolysaccharidiques (difficile en raison de la multitude des sérotypes) et dosage des anticorps antihémolysine (pneumolysine) plus prometteur, ce dosage pourrait rendre des services dans une perspective de diagnostic.

Pour ces réactions sérologiques, il est indispensable de disposer d'un sérum précoce et d'un sérum tardif et de vérifier la montée des anticorps.

VI - SENSIBILITÉ DES PNEUMOCOQUES AUX ANTIBIOTIQUES

L'étude de la sensibilité des pneumocoques n'est pas toujours simple. L'idéal serait de déterminer la CMI de chaque antibiotique pour chaque souche de pneumocoque, ce qui est pratiquement impossible en routine. L'antibiogramme doit être réalisé, sous réserve de respecter quelques règles précises.

A - Technique de l'antibiogramme pour le pneumocoque

- Une colonie isolée est d'abord cultivée en bouillon enrichi en sérum ascite pendant 18 heures,
- on prélève 4 à 8 gouttes de ce bouillon que l'on place dans 10 ml d'eau distillée,
- on ensemence par inondation un milieu de Mueller-Hinton additionné de 5 % de sang de cheval ou de mouton,
- on dépose les disques d'antibiotiques et on incube pendant 18 h en atmosphère de CO₂,
- on procède ensuite à la lecture des diamètres des zones d'inhibition.

B - Résultats

Les principaux problèmes concernent la pénicilline G : le pneumocoque se situe souvent, pour cet antibiotique, dans les zones de sensibilité intermédiaire, alors qu'en dilution, la souche est sensible. On peut contourner cette difficulté. En effet, il faut savoir que les CMI de l'oxacilline vis-à-vis du pneumocoque sont 30 fois plus élevées que la CMI de la pénicilline G. Autrement dit, si le diamètre de la pénicilline G est faible ou en zone intermédiaire, il est préférable de mesurer le diamètre autour de l'oxacilline (charge 5 p.g) avant de répondre pour la pénicilline G (Tableau II). Ceci doit être systématiquement exécuté et l'on doit répondre lorsqu'une souche est résistante à l'oxacilline, que toutes les bêta-lactamines sont résistantes.

Comme pour tous les streptocoques les aminosides sont inefficaces; Les céphalosporines ne sont pas plus actives que la pénicilline G ; les céphalosporines de la troisième génération (céfotaxime, ceftriaxone) ont toutefois des CMI assez basses (0,001 - 0,06 mg/1).

TABLEAU
 INTERPRÉTATION DE L'ANTIBIOGRAMME POUR LES BÊTA-LACTAMINES

Pénicilline G CMI mg/l	Pénicilline G diamètre en mm	Oxacilline diamètre en mm	Réponse
0,003 - 0,06	38-40	>28	Souches sensibles
0,01 - 1	28-35	10-15	Souches intermédiaires
1,0 - 10	28	<10	Souches résistantes à toutes les bêta-lactamines

Le premier cas de résistance à la tétracycline a été signalé en 1962. En 1967, des résistances à l'érythromycine et à la lincomycine apparaissent et, la même année, on signale l'isolement d'une souche résistante à la pénicilline G. En 1970, des publications décrivent des souches résistantes au chloramphénicol. En 1977, à Johannesburg, des souches résistantes aux P lactamines, à l'érythromycine, à la clindamycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole ont été isolées.

En France, la résistance vis-à-vis des synergistines est en progression, elle est stable pour le chloramphénicol (5 à 6 %), pour les tétracyclines depuis 1986 (environ 20 %) et le cotrimoxazole (13 à 16 %) ; mais la résistance est régulièrement croissante pour l'érythromycine passant de 18,9 % en 1984 à 23,6 % en 1988.

Au niveau mondial, la répartition des souches résistantes à la pénicilline est très irrégulière (Figure 1 selon Klugman) ; en France cette résistance à la pénicilline G est en progression, l'ensemble des souches à sensibilité anormale (CMI = 0,1 mg/l) approche 5 % (3 % pour les souches invasives, 6 % pour les souches non invasives), ces souches anormales se répartissent entre souches de moyenne sensibilité (4,5 %) et souches réellement résistantes (0,5 %).

Les mécanismes des résistances aux antibiotiques du pneumocoque commencent à être mieux compris.

Pénicilline : la résistance non transférable, non liée à la production d'une bêta-lactamase est d'origine chromosomique et due à des modifications des PLP.

Macrolides : la résistance croisée macrolides-lincosamides-streptogramines B (phénotype résistant M.L.S_g) est essentiellement due à une méthylation de l'ARNr 23S qui diminue l'affinité des MLS pour le ribosome.

On a démontré pour certaines souches que le chromosome portait un "transposon conjugatif" codant pour une enzyme APH (3') responsable de la résistance à haut niveau à la kanamycine associée à la résistance pour le M.L.S_B et les tétracyclines, cet élément est transmis de façon stable à la descendance et joue probablement un rôle dans la diffusion de la résistance.

Chloramphénicol : cet antibiotique est inactivé par une chloramphénicol-acyl-transférase inductible non liée à un déterminant plasmidique.

VII - VACCINS ANTIPNEUMOCOCCIQUES

A - Composition

Pour faire face aux résistances aux antibiotiques et pour empêcher la mortalité qui reste élevée même avec l'aide d'un traitement antibiotique actif, on a mis au point un vaccin anti-pneumococcique. Il n'était pas possible d'incorporer les 83 sérotypes dans le vaccin. On a donc choisi les sérotypes d'après leur plus grande fréquence. Les vaccins actuels ont 23 valences qui correspondent aux types suivants de *Streptococcus*

pneumoniae : 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F. Dans ce vaccin à 23 valences, il y a 25 u,g de chaque polysaccharide. Il est protecteur vis-à-vis de 90 % des souches isolées en France et en Europe.

On a démontré que les polysaccharides purifiés des pneumocoques induisent la formation des anticorps. Ces anticorps se fixent sur la capsule, ils attirent les cellules phagocytaires et favorisent ainsi l'ingestion bactérienne, c'est-à-dire l'opsonisation.

Les fabricants ont dû doser les anticorps avant et après la vaccination. Il fallait, pour chaque valence, vérifier qu'il y avait une montée des anticorps entre un sérum précoce et un sérum tardif. On peut considérer qu'un vaccin est acceptable si on a une montée des anticorps au moins de quatre fois vis-à-vis des différents antigènes contenus dans le vaccin pour 80 % des sujets.

B - Efficacité immunologique du vaccin

Lors d'études récentes réalisées avec les vaccins commerciaux, on a démontré que 90 % des sujets avaient une multiplication par 4 du taux de leurs anticorps.

Le vaccin est administré en une fois. Il serait protecteur pour trois ans, mais il n'est pas efficace chez les enfants de moins de 2-3 ans. Il n'y a pas d'immunité croisée entre les 14 sérotypes. On peut noter que le sérotype 6 est très peu immunogène. Il est conseillé de ne pas revacciner avant 5 ans, une revaccination précoce peut donner lieu à des effets indésirables.

On observe des échecs :

- chez les jeunes enfants, chez les sujets âgés,
- dans les maladies de Hodgkin,
- après splénectomie, aussi est-il préférable de vacciner les candidats à la splénectomie avant celle-ci,
- dans les syndromes néphrotiques où les résultats sont souvent discordants,
- dans les hémopathies, la réponse n'est pas toujours bonne ; par contre, elle est correcte chez les drépanocytaires.

BIBLIOGRAPHIE

CADOZ M., ARMAND J., MICHEL J.P., MICHEL M., DENIS F., SCHIFFMAN G-, « A new 23 valent pneumococcal vaccine : immunogenicity and reactogenicity in adults ». *J. Biol. Standardization*, 1985,**13**, 261-265.

DENIS F., FLEURETTE J., LAURENS G., MOULIN A., MOUNIER M., ORFILA J., REVERDY M.E., « A latex agglutination technique for rapid direct identification of pneumococci in blood cultures », *Eur. J. Clin. Microbiol*, 1984, **3**, 321 - 322.

DENIS F., SAULNIER M., CHIRON J.P., « Diagnostic étiologique rapide des méningites purulentes par agglutination passive inverse de particules de latex et par contre-immunoelectrophorèse ». *Bull. Org. Mond. Santé*, 1981, **59**, 143-151.

GESLIN P., Rapport du Centre National de Référence du Pneumocoque (1988), *Bull. Epidem. Hebdomad.*, 1990, n° 17, 74-75.

GESLIN P., FREMAUX A., SISSIA G., « *S. pneumoniae* et infections bronchopulmonaires. Diagnostic microbiologique, sensibilité aux antibiotiques ». *Rev. Fr. Lab.*, 1990, n° 204, 37-44.

KLUGMAN K.P., « Pneumococcal resistance to antibiotics », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, **3**, 171-196.

LUND E., HENRICHSEN J., « Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *S. pneumoniae*, in *Methods in microbiology* », 1978, vol. 12, Académie Press, Ed. London, New York, San Francisco.

PATHOLOGIE ET BIOLOGIE, n° spécial *Pneumocoque*, 1979, tome 27.,

ROBBINS.J.B., AUSTRIAN R., LEE C.J., RASTOGI S.C., SCHIFFMAN G., HENRICHSEN J., MADELA P.H., BROOME C.V., FACKLAM R.R., TIESJEMA R.H., PARKE J.C., « Considérations for formulating the second génération pneumococcal polysaccharide vaccine with emphasis on the cross reactive types within groups », *J. Infect. Dis.*, 1983,**148**, 1136-1159.

SECTION II — *NEISSERIACEAE*

CLASSIFICATION DES NEISSERIACEAE

Cette famille comprend classiquement les genres :

- I *Neisseria*
- II *Moraxella*
- III *Acinetobacter*
- IV *Kingella*
- V *Oligella*

Le genre *Acinetobacter* est rattaché à cette famille, mais ses caractères sont très différents de ceux des autres *Neisseriaceae* (absence d'oxydase et de nitrate réductase). Par contre, *Branhamella* et *Moraxella* sont proches génétiquement bien que la morphologie les différencie. Ils ont été réunis au sein d'un même genre (*Moraxella*) avec deux sous-genres (*Moraxella* et *Branhamella*). Au genre *Oligella*, nouvellement créé, sont rattachées les souches antérieurement désignées comme *Moraxellaurethralis*.

Cette famille est hétérogène **et des remaniements taxonomiques sont à attendre.**

<i>MORAXELLA</i>					
	<i>Neisseria</i>	sous-genre <i>Branhamella</i>	sous-genre <i>Moraxella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Kingella</i>
Morphologie	cocci	cocci	coccobacille	coccobacille	bacille
division	2 plans	2	1	1	1
pénicilline	S	S	S	R	S
oxydase	+	+	+	-	+
nitrate réd.	±	+	±		+
G + C %	47-52	40-45	40-46	39-47	47-55

Chapitre IV

LES NEISSERIA

CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Les *Neisseria* sont des cocci à Gram négatif, associés en diplocoques, parfois en tétrades, et immobiles. Bactéries aérobies strictes, à métabolisme uniquement respiratoire (une respiration des nitrates et/ou des nitrites est possible). Ils sont toujours catalase (+) et possèdent une cytochrome **C oxydase**. Leurs potentialités métaboliques sont limitées. Ce sont des hôtes habituels des muqueuses de l'homme et de l'animal. Ils peuvent être cultivés sur les milieux usuels (gélose au sang). A l'isolement, *N. meningitidis* nécessite du CO₂ mais cette exigence se perd au repiquage. *N. gonorrhoeae* est l'espèce la plus exigeante et nécessite des milieux riches et du CO₂ pour sa culture. La température de culture optimale est de 35 à 37°C. Le gonocoque et le méningocoque poussent de 30 à 38°C. Les autres *Neisseria* peuvent se **développer** à température ambiante (20°C).

NEISSERIA GONORRHOEAE

HISTORIQUE

Le gonocoque a été observé pour la première fois par Neisser en 1879 dans un pus urétral et en 1882 Leistikov et Loeffler réalisent la première culture sur sérum coagulé. C'est l'agent de la blennorragie connue depuis la plus haute antiquité puisque la première description a été faite en 2637 av. J.-C. par l'empereur chinois Huang Ti. Considérée longtemps comme une forme clinique de la syphilis (Hunter), la gonococcie a été individualisée par Ricord en 1830. Considérée longtemps comme la maladie sexuellement transmise (MST) la plus répandue, la gonococcie a laissé la place aux infections vénériennes à *Chlamydia trachomatis*. Cependant, les infections à gonocoque posent un problème de santé publique qui se complique par l'augmentation régulière de leur résistance aux antibiotiques.

1 - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

C'est un parasite strict de l'homme, hôte des muqueuses des voies génitales de l'homme et de la femme et dont la transmission est presque exclusivement sexuelle.

Le problème épidémiologique est simple en apparence :

- l'homme est le seul réservoir de germes ;
- le gonocoque est sensible aux antibiotiques.

De 1955 au début des années 1980, il y a eu une recrudescence des gonococcies avec augmentation de la résistance du gonocoque. Depuis, l'incidence de la gonococcie est en nette diminution en raison d'une meilleure prévention liée à l'épidémie du SIDA.

A - Facteurs favorisant la dissémination

Dans une ville, la prévalence d'infection est élevée dans les quartiers à bas niveau socio-économique, où les gonococcies sont endémiques. A partir de ce "noyau" l'infection s'étend aux autres quartiers de la ville où les cas observés sont sporadiques et la prévalence est faible.

Les gonococcies sont favorisées par l'urbanisation, les voyages (tourisme, voyages d'affaire), la promiscuité, les saisons (été).

Chez les individus, les infections sont liées à une facilité, une précocité et une multiplicité des rapports sexuels. Elles sont aussi favorisées par l'utilisation de contraceptions hormonale ou instrumentale qui s'accompagnent de l'abandon des moyens physiques classiques.

Comme toutes les MST, les gonococcies sont plus fréquentes dans les villes en particulier celles qui sont des lieux de passage (port).

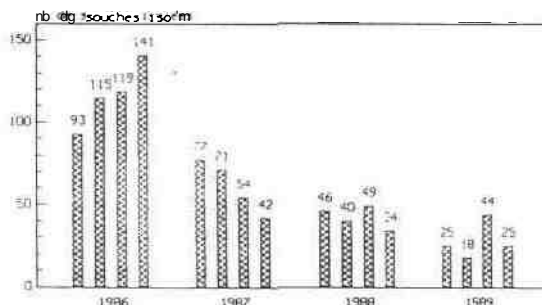
B - Certains facteurs individuels jouent un rôle important dans cette dissémination

- L'existence de formes asymptomatiques (femmes) non dépistées ;
- La susceptibilité individuelle : pour la femme tous les rapports avec un partenaire atteints de blennorragie sont supposés infectants, mais chez l'homme, seuls 20 % le sont.

C - Evolution actuelle

Une nette décroissance du nombre d'isollements de souche de gonocoque est observée en France depuis 1980 (voir schéma). Cette décroissance semble se ralentir car les campagnes de prévention n'atteignent pas la totalité de la population à risque.

Evolution trimestrielle du nombre de souches de gonocoques isolées par le réseau RENAGO (1988-1989)



source : Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire n° 12/1990

II - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Adulte

1. Infections locales génitales

- Chez l'homme : la blennorragie est une urétrite antérieure aiguë avec écoulement de pus parfois abondant et une dysurie (chaude-pisse). Elle survient après une incubation de 1 à 15 jours (3 à 5 en général). Elle guérit sans traitement en 15 jours à 6 mois. Cette urétrite peut être subaiguë (5 à 15 %) et parfois asymptomatique. Des complications sont possibles : infections ascendantes (orchite, épидидymite, prostatite). Les infections répétées peuvent entraîner un rétrécissement de l'urètre.
- Chez la femme : c'est le plus souvent une cervicite, en général cliniquement muette (80 % des cas) avec parfois des pertes purulentes ou une urétrite. Les complications possibles sont une infection ascendante avec pyosaiptynx entraînant une obstruction tubaire en l'absence de traitement. Les infections chez la femme peuvent persister 6 mois. Elles sont la source principale de dissémination du gonocoque.

2. Infections locales extra-génitales liées aux habitudes sexuelles

Une infection pharyngée est en général asymptomatique, un érythème ou une amygdalite pouvant l'accompagner.

Les infections anales touchent environ 4 % des consultants (femmes ou homosexuels masculins). En général, elles sont asymptomatiques avec parfois un ténésme, une proctite avec sécrétions mucopurulentes dans lesquelles le gonocoque peut être mis en évidence.

Les infections oculaires sont plus rares.

3. Infections disséminées

Elles représentent 1 à 3 % des gonococcies. Elles ont pour origine l'une des localisations précédentes. La septicémie peut entraîner des arthrites (polyarthralgie, arthrite purulente), des lésions cutanées (maculo-papules parfois nécrotiques des extrémités), une endocardite (rare, mais grave), une méningite (exceptionnelle).

B - Chez l'enfant

Chez le nouveau-né : ophtalmie purulente pouvant entraîner la cécité. La contamination se fait au moment de l'accouchement, lors du passage dans les voies génitales. Prophylaxie : la méthode de Credé (instillation de collyre au nitrate d'argent ou à un antibiotique non sensibilisant) est obligatoire à la naissance en France.

Les infections gonococciques des enfants posent toujours des problèmes médico-légaux (inceste, viol...).

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Elle est mal connue, mais un modèle théorique a été développé avec les étapes suivantes :

- attachement aux cellules épithéliales
- invasion active par endocytose
- développement de l'infection sous l'épithélium.

N. gonorrhoeae possède des récepteurs pour la transferrine et la lactoferrine et il est capable d'en extraire le fer nécessaire à sa croissance.

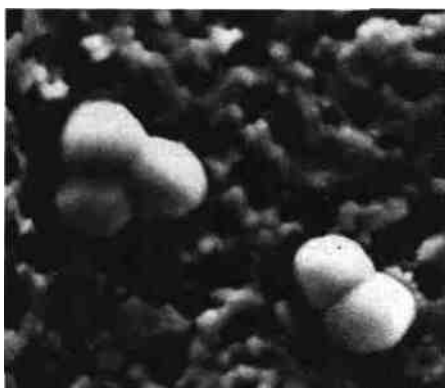
A ce stade si des anticorps sont produits, les bactéries sont opsonisées, phagocytées avec formation de pus. Les gonocoques intra-leucocytaires ne sont pas viables.

Les facteurs qui pourraient jouer un rôle dans le pouvoir pathogène sont :

- les pili
- les facteurs d'attachement
- les protéases clivant les IgA₁
- la résistance à l'action bactéricide du sérum.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie



Dans un pus urétral *N. gonorrhoeae* se présente sous l'aspect de diplocoques à Gram (-), 0,7 x 1 µm de diamètre avec une face plane, une face arrondie réniforme et accolés par leur face plane en « grains de café ». Ils sont intracellulaires, dans le cytoplasme des polynucléaires ou extracellulaires. En culture ils sont polymorphes avec des formes géantes (autolyse), isolés, en diplocoques ou en tétrades.

B - Caractères cultureux

La culture est difficile en raison des **multiples** exigences métaboliques. Le CO₂ est nécessaire à la croissance du gonocoque. La température optimale de croissance est de 35 à 37°C. Il est sensible aux acides gras contenus dans la gélose (addition d'hémine, de sang, ou d'amidon pour prévenir cette toxicité). Il est sensible aux métaux lourds. L'exigence en cystéine est caractéristique de l'espèce. Certaines souches sont exigeantes en glutamine, thiamine ou thiamine pyrophosphate. Ces composés devront être ajoutés au milieu après stérilisation (PolyVite X, Supplément G...). Le fer est indispensable.

La croissance de *N. gonorrhoeae* est inhibée par certaines espèces (streptocoque hémolytique de groupe B, levures). Aussi ajoute-t-on les antibiotiques dans le **milieu de culture sélectif** (milieu VCF ou VCN) :

- vancomycine qui inhibe les bacilles à Gram (+) et cocci à Gram (+),
- colistine qui inhibe les bacilles à Gram (-),
- fùngizone ou nystatine qui inhibe les levures,
- parfois du cotrimoxazole qui inhibe le *Proteus* (prélèvements anaux).

Ces produits inhibent 2 à 5 % des souches de gonocoques mais permettent son isolement dans les prélèvements plurimicrobiens (prélèvements vaginaux).

Kellogg a décrit 4 types de colonies selon leur aspect en transillumination oblique sur un milieu translucide.

A l'isolement les types 1 et n (colonies de petite taille) correspondent aux souches virulentes porteuses de pili.

Après repiquage les type III et IV (colonies plus larges) correspondant aux bactéries ayant perdu leurs pili deviennent prédominantes et finissent par être seules présentes.

C - Vitalité

Elle est faible. Le gonocoque ne supporte pas la dessiccation, il faut donc faire un ensemencement immédiat sur milieux sélectifs ou utiliser des milieux de transport.

Le milieu de Smart au thioglycolate et au charbon activé permet la survie de la bactérie 24 à 48 heures.

Le « Transgrow Médium » est un milieu de culture en flacon hermétique contenant 10 % de CO₂. On peut expédier immédiatement le prélèvement ensemencé ou après une préculture de 18 à 24 h. C'est le meilleur système de transport disponible.

La conservation des souches peut se faire en gélose ascite (environ 15 jours) mais il vaut mieux utiliser la lyophilisation et surtout la congélation à -80°C en bouillon glycérine contenant du sérum de cheval.

Le gonocoque est inhibé par le coton des écouvillons (hypochlorite...). Il faut utiliser pour les prélèvements des écouvillons en alginate de calcium ou en dacron.

D - Structure antigénique

Les protéines de membrane externe : 3 protéines majeures ont été décrites. PI qui présente deux types principaux PI_A et PI_G au sein desquels il est possible de définir de nombreux sérovars grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Une classification des souches a été proposée et elle est utilisée actuellement pour les études épidémiologiques. La protéine PU est variable non seulement d'une souche à l'autre mais présente aussi des variations pour une même souche qui se traduisent par une modification de l'aspect des colonies. La protéine PIII est stable et elle est présente également chez *Neisseria meningitidis*.

Les pili possèdent également une grande diversité antigénique. Leur présence est liée à l'aspect des colonies à la surface de la gélose, à la mobilité par glissement, à la compétence pour la transformation et à la virulence (attachement aux cellules épithéliales, résistance à la phagocytose).

N.B. Il existe également un facteur d'attachement différent des pili.

E - Immunité

La variabilité antigénique des souches de gonocoque peut expliquer la chronicité des infections non traitées et l'absence de protection contre les réinfections. Elle permet aussi de comprendre les difficultés de la mise au point d'un vaccin malgré les multiples études.

Les infections gonococciques disséminées sont liées à une déficience en certains composants du complément, en particulier C6, C7 et C8. Celle-ci entraînerait une prédisposition aux infections à *Neisseria*.

F - Pouvoir pathogène expérimental

Les modèles développés sont artificiels : chambre sous-cutanée chez le cobaye ou la souris, culture d'organe.

Cependant ils ont permis de connaître le déroulement de l'infection locale et servent pour les études de virulence des souches ou les études de protection passives.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Prélèvements

1. Chez l'homme

Le prélèvement sera effectué dans l'urètre antérieur sur 2 à 3 cm avec un écouvillon en alginate de calcium, ou une goutte de pus sera prélevée au méat avec une ase.

Il est possible de réactiver l'infection en faisant boire de la bière la veille au patient.

Les prélèvements seront effectués le matin avant toute miction.

2. Chez la femme

Le prélèvement sera fait :

- dans l'endocol ou éventuellement dans les culs de sac postérieurs (après pose d'un spéculum sans lubrifiant)
- à l'orifice méatique, soit par écouvillonnage, soit en exprimant une goutte de pus en pressant l'urètre contre la symphyse pubienne.
- éventuellement à l'orifice des glandes de Bartholin ou de Skène.

3. Dans les deux sexes

- anus : prélèvement avec un écouvillon dans le canal anal (sur 5 cm)
- pharynx : piliers de l'amygdale
- peau : grattage de lésions, biopsie
- liquides articulaires par ponction
- hémoculture.

Dans tous les cas il faut ensemercer immédiatement les milieux de culture **ou** utiliser un milieu de transport.

B - Examen direct

La présence de diplocoques à Gram négatif intra et extra-cellulaires dans un pus d'urétrite aiguë permet le diagnostic de gonococcie dans au moins 90 % des cas. Par contre, pour les autres prélèvements, seule la culture est fiable.

C - Ensemencement et culture

- échantillon mono-microbien (urètre, sang, pus...) ; sur un milieu non sélectif.
- échantillon pluri-microbien (gorge, vagin) sur milieu sélectif, type VCF.

Le diagnostic de gonocoque est établi sur les caractères suivants :

- la croissance sur milieu sélectif de cocci à Gram (-)
- l'aspect des colonies
- **l'oxydase** à rechercher soit avec un disque imprégné du réactif chlorhydrate de tétraméthyl-paraphénylène-diamine, soit en inondant la boîte avec le réactif en repiquant les colonies suspectes dès qu'elles deviennent rosés.
- l'acidification des sucres : seul le glucose est acidifié.

Cette acidification peut être recherchée sur milieu cystine-tryptic agar (milieu CTA) ou à l'aide de galeries commercialisées, prêtes à l'emploi.

La recherche directe de *N. gonorrhoeae* dans les prélèvements peut être faite par des techniques immunologiques (ELISA, immunofluorescence directe). Leurs résultats sont tout à fait satisfaisants chez les hommes, mais leur sensibilité est faible

chez les femmes quand on les compare à la mise en culture. Des techniques mettant en jeu des sondes d'ARN ou d'ADN sont actuellement à l'étude.

Ces techniques de diagnostic direct ne permettent pas la réalisation d'antibiogramme. Ce dernier est indispensable car la résistance des souches aux 6-lactamines et aux cyclines est de plus en plus fréquente.

Etant donné son faible coût, la mise en culture du prélèvement est préférable.

Par contre le diagnostic conventionnel de *N. gonorrhoeae* par les caractères biochimiques peut être remplacé par des méthodes rapides :

- immunologiques : elles mettent en jeu des anticorps monoclonaux (coagglutination de staphylocoque porteur de protéine A, utilisation d'anticorps marqués à la fluorescéine)
- enzymatique : recherche de l'hydroxyproplylaminopeptidase spécifique.

N.B. *N. kochii* est une *Neisseria* qui ressemble à *N. gonorrhoeae* au point de vue biochimique. En culture, il forme de grosses colonies pigmentées. Isolée d'urétrites en Egypte, cette bactérie est considérée comme une sous-espèce de *N. gonorrhoeae*.

D - Diagnostic sérologique

Depuis l'abandon de la gono-réaction il n'y a pas actuellement de diagnostic sérologique de la gonococcie.

VI - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

A - Méthodes d'étude

L'antibiogramme doit être réalisé de préférence sur le milieu GC médium base supplémenté, translucide (milieu de Kellogg). On utilise la technique des disques par diffusion en milieu gélose en respectant certaines règles concernant l'inoculum et la charge des disques.

Six antibiotiques doivent être testés :

- pénicilline et/ou ampicilline,
- chloramphénicol,
- doxycycline (ou une autre tétracycline semi-synthétique),
- érythromycine (ou un autre macrolide),
- spectinomycine (apparenté aux aminosides),
- rosoxacine (quinolone).

Pour les souches productrices de bêta-lactamase, il peut être intéressant de rechercher la sensibilité à une céphalosporine de 3^e génération (céfotaxime).

L'observation d'une culture au contact du disque de pénicilline permet de suspecter une souche productrice de **bêta-lactamase**. Cette enzyme doit être systématiquement recherchée par l'une des méthodes suivantes :

- acidimétrie avec bandelettes imprégnées de pénicilline G et d'un indicateur de pH, l'acide pénicilloïque formé modifie de pH du milieu ;
- la méthode de référence à la nitrocéfine (céphalosporine chromogène) : son hydrolyse par la pénicillinase entraîne la formation d'un composé pourpre ;
- la méthode à l'iode : décoloration du papier imprégné d'amidon et coloré par le lugol car l'acide pénicilloïque a une plus grande affinité pour l'iode que l'amidon ;
- la méthode Gots sur boîte de pétri avec une souche indicatrice sensible à la pénicilline (*Sarcina*).

B - État actuel de la sensibilité aux antibiotiques

A la différence des autres *Neisseria*, le gonocoque est résistant aux aminosides *in vitro*. Il est cependant sensible *in vivo*. Un aminoside est réservé au traitement de la gonococcie : la spectinomycine (CMI : 8-32 mg/1). Peu de souches sont résistantes à cet antibiotique.

En règle générale le gonocoque est sensible à la pénicilline (CMI = 0,03 mg/1), mais cette sensibilité diminue régulièrement et le pourcentage des souches résistantes (CMI > 0,25 mg/1) s'élève régulièrement.

La résistance chromosomique est due généralement à une modification de la membrane externe ; elle porte alors sur plusieurs antibiotiques simultanément (par exemple, pénicilline, ampicilline, tétracyclines, érythromycine).

La résistance plasmidique, due à un plasmide codant une bêta-lactamase de type TEM 1, a été rapportée dans tous les pays du monde. Elle est très fréquente dans les pays anglophones.

En France elle concerne 1 à 10 % des souches de gonocoques, selon la région.

La résistance plasmidique à la pénicilline donne une CMI très élevée (CMI > 32 mg/1) à la différence de la résistance chromosomique (CMI = 2-4 mg/1).

Récemment une résistance de haut niveau à la tétracycline a été décrite dans plusieurs pays. Elle est d'origine plasmidique.

VII - LE TRAITEMENT

A - Traitement curatif

Il doit être :

- efficace,
- sans effets secondaires,
- pouvoir être prescrit à tous les patients,
- agir rapidement pour briser la chaîne de contamination,
- ne doit pas masquer une autre MST (syphilis) ou alors la traiter également.

Le plus souvent de nombreux antibiotiques peuvent être utilisés.

Les recommandations actuelles du CDC sont les suivantes :

- Pour une urétrite aiguë ou une cervicite
ceftriaxone 250 mg IM en une fois suivi de doxycycline 250 mg par jour pendant 7 jours (pour traiter également une éventuelle infection à *Chlamydia trachomatis*. La spectinomycine (2 g IM en une fois) ou la ciprofloxacine (500 mg per os en une fois) peuvent également être administrées.
Dans les régions à faible prévalence de souches productrices de B-lactamase, on peut utiliser l'amoxicilline (3 g per os) associée au probenecid (1g per os) en une fois.
- Pour une salpingite
céfotaxime 2 g IV toutes les 6 heures pendant au moins 48 heures plus doxycycline 20 mg prjour per os pendant 10 à 14 jours.
- Pour une infection disséminée
ceftriaxone 1g par jour ou céfotaxime 3 g par jour pendant 7 jours.
Les traitements courts suffisent en général pour guérir une gonococcie.

B - Traitement prophylactique

Il n'existe pas de vaccin. Il ne faut pas faire de traitements antibiotiques systématiques ; ils comportent plus de risques qu'ils n'apportent de résultats et entraînent une augmentation de la résistance des souches aux antibiotiques. La prophylaxie sera essentiellement individuelle (antiseptiques vaginaux, condom, hygiène, méfiance) ou générale (éducation, information, dépistage, visite périodique des sujets à risque).

NEISSERIA MENINGITIDIS

Anciennement appelé *N. intracellularis*, le méningocoque a été découvert par Weichselbaum en 1887 dans le LCR d'un sujet atteint de méningite aiguë. Proche du gonocoque, il est responsable de méningites purulentes aiguës (méningite cérébrospinale = MCS) et de septicémies gravissimes. Son isolement dans les prélèvements pharyngés est fréquent. Depuis quelques années il est isolé de prélèvements génitaux et exceptionnellement de prélèvements anaux.

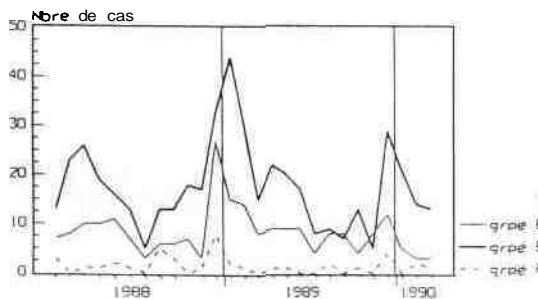
1 - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Hôte exclusif de l'homme, *N. meningitidis* est isolé habituellement de prélèvements rhinopharyngés

Il existe 3 sérogroupes principaux : A, B et C qui ont les mêmes caractéristiques épidémiologiques. Leur répartition est différente et la prédominance suivante est observée

- A Afrique, Sahel, pourtour méditerranéen
- A et C Amérique du Nord et du Sud
- B Europe occidentale

Distribution mensuelle des cas déclarés
d'infection à méningocoque par séro-groupe
(Janvier 1988-mars 1990) FRANCE



source : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire n° 26/1990

Depuis quelques années, les isollements de séro-groupe C sont plus fréquents en Europe et la prévalence du séro-groupe B augmente en Amérique Latine où il provoque des épidémies.

Le séro-groupe Y provoque des atteintes isolées souvent sérieuses. Les autres sérogroupes ne sont qu'exceptionnellement en cause dans les méningites.

Les infections à méningocoque présentent des variations saisonnières : (hiver, saison froide) favorisées par la surpopulation (promiscuité, manque d'hygiène, collectivités fermées) responsable de l'essaimage du germe. Dans les villes par

exemple elles surviennent dans les quartiers à bas niveau socio-économique. En Afrique, la saison sèche correspond à une sédentarisation de la population, liée à une augmentation de la promiscuité.

Le portage pharyngé

Il diminue avec l'âge ; chez les sujets de 15 à 30 ans il y a environ 10 % de porteurs sains. Le portage est parfois long (6 mois).

Le nombre de cas de méningite par rapport au taux de portage est très faible (1 pour 10 000).

Cette fréquence élevée de portage traduit une transmission facile du germe par voie aérienne. Cette transmission est capricieuse et on ne sait pas déceler les sujets réceptifs. L'entourage du malade et le personnel soignant font rarement une méningite, même s'ils sont porteurs de germe. Ceci explique que le traitement du portage peut être considéré comme inutile car le germe peut avoir disparu avant le traitement et la souche hébergée n'est pas forcément la même que celle du malade.

En dépit des difficultés pour appréhender l'épidémiologie du méningocoque, on peut édicter quelques règles simples de prophylaxie :

- le diagnostic de la maladie avec identification précise du germe et groupage sont indispensables.
- l'interrogatoire est nécessaire pour essayer de trouver une cause déclenchante.
- les mesures d'hygiène sont à préconiser pour les sujets contacts : éviter la fatigue, le stress, faire une surveillance médicale, vacciner si le méningocoque en cause appartient au groupe A ou C et faire une prophylaxie médicamenteuse en milieu fermé. Certaines mesures sont inutiles : la désinfection pharyngée, la désinfection des locaux, la recherche de portage dans l'entourage, la prophylaxie de masse, l'éviction scolaire des frères et soeurs et le traitement du portage en milieu ouvert.

II - POUVOIR PATHOGÈNE DE *N. MENINGITIDIS*

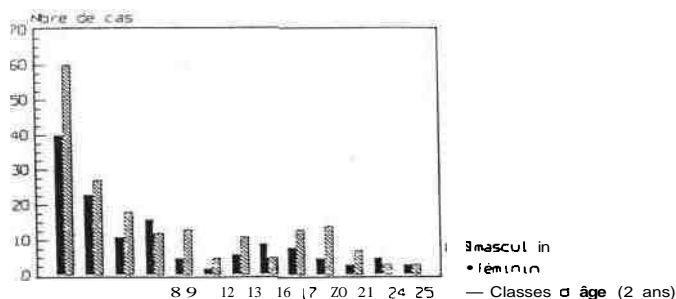
A - Méningite cérébro-spinale

Elle fait suite à une infection pharyngée qui est souvent muette.

1. La forme méningitique

Elle est observée le plus souvent chez l'enfant avant 5 ans et l'adolescent. C'est une urgence médicale : le diagnostic doit être précoce, le traitement immédiat ; la ponction lombaire fait le diagnostic.

Répartition par âge et par sexe
des infections à méningocoque (1989)
(entre 0 et 25 ans)



source : **Bulletin**
Épidémiologique
Hebdomadaire
n° 26/1990

Du point de vue clinique : le « trépied méningitique » (les trois signes caractéristiques de la méningite) est composé de l'association de céphalées, de vomissements et d'une raideur méningée (signe de Kemig), associés à une fièvre, une photophobie et des arthralgies. Ces signes peuvent être masqués par un traitement antibiotique intempestif, insuffisant (méningite décapitée) rendant le diagnostic difficile.

Le tableau est différent chez le nourrisson : hypotonie, trouble du comportement, convulsions et hyperthermie.

Sans traitement la maladie est mortelle, mais une antibiothérapie précoce et bien conduite amène une guérison sans séquelle dans la majorité des cas.

Le purpura fulminans de Henoch (ou syndrome de Waterhouse-Friderichsen) avec collapsus est une forme foudroyante proche des formes septicémiques suraiguës.

2. La forme septicémique

La méningite n'est pas observée ou c'est un élément secondaire du tableau. Les signes cliniques associent une température 40°C, un état général altéré, avec cyanose, un purpura, des arthralgies. L'évolution se fait vers l'état de choc et un décès rapide parfois en quelques heures (*purpura fulminans*).

B - Infections locales

Elles se traduisent par des infections pharyngées (angine érythémateuse), des infections respiratoires banales (service de réanimation), des infections vénériennes, rares : (urétrites, proctites) chez les homosexuels. La bactérie peut être isolée en l'absence de tout signe clinique.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Il est admis que le germe pénètre dans le rhinopharynx par voie aérienne, provoquant une infection locale en général inapparente qui persiste plusieurs mois. Cette contamination est immunisante et l'immunité conférée est protectrice.

La raison de survenue d'une infection systémique est inconnue. Une infection locale (virale, par exemple) peut favoriser le développement du germe et son essaimage à partir du rhinopharynx.

Cette diffusion se fait par voie hémotogène (on a abandonné la notion de passage à travers la lame criblée de l'éthmoïde sauf après traumatisme crânien).

Une septicémie accompagne toujours la méningite et peut être observée seule dans les formes graves. Le germe peut se fixer dans les méninges (cette affinité reste inexpliquée) mais aussi dans les articulations, les poumons, la peau,...

La méningite est une inflammation des méninges avec exsudât purulent et hyperleucocytose. La multiplication de la bactérie est extra-cellulaire et après phagocytose le méningocoque n'est plus viable.

Les manifestations secondaires des formes fulminantes sont dues, sans doute, à l'endotoxine. La virulence du germe est liée à la capsule. Le sérotype Y est particulièrement virulent. La survenue d'infections à méningocoques peut être liée à un déficit en facteurs du complément.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Diplocoque à Gram (-) en grains de café.

B - Caractères cultureux

Les souches sont exigeantes en CO₂ à l'isolement, mais elles peuvent être cultivées sur des milieux plus simples que le gonocoque (gélose chocolat). Cependant, pour les prélèvements pharyngés, un milieu sélectif (gélose à l'hémine avec VCF) est indispensable pour son isolement.

Une meilleure culture est obtenue avec les milieux riches. Les conditions de culture sont les mêmes que pour le gonocoque. Il pousse de 30°C à 38°C, mais la croissance est meilleure que celle du gonocoque : colonies de 1 à 2 mm de diamètre après 24 h : colonies bombées, luisantes. Les variations d'aspect décrites pour le gonocoque ne sont pas retrouvées chez le méningocoque. L'exigence en fer est également observée.

C - Vitalité, conservation des souches

C'est une bactérie fragile et sensible aux variations de température, au froid et à la dessiccation. Il faut donc prendre les mêmes précautions que pour le gonocoque : ensemencement immédiat pour LCR et hémoculture et milieu de transport pour les autres prélèvements.

- Conservation : lyophilisation ou congélation à -80° C
- Transport : milieu de Stuart (au charbon activé) ou milieu à l'oeuf de Vandekerkove.

D - Caractères biochimiques

Oxydase (+), gamma-glutamyl-transférase (γGT) (+).

Acidification du glucose et du maltose,

Réduction des nitrites par 68 % des souches.

L'exigence en cystéine est rare.

E - Structure antigénique

La nature du polysaccharide de la capsule permet de distinguer 13 sérogroupes : les plus fréquents sont A, B, C, W135, X et Y, les autres (29E, Z, H, I, K, L) sont isolés plus rarement.

La spécificité antigénique est liée à la structure du polysaccharide :

- séro-groupe A = 2 acétamido-2 déoxy-D-mannopyranosyl
- séro-groupe B = acide N-acétylneuraminique
- séro-groupe C = acide N-acétyl-0-acétylneuraminique

Ces antigènes permettent d'obtenir chez le lapin des immunosérums homologues qui agglutinent les souches de méningocoques. Ces antigènes sont répandus dans la nature et entraînent des réactions croisées avec d'autres espèces. (Ex. séro-groupe B = *E. coli* K1).

Un faible pourcentage des souches n'est pas agglutinable avec les sérums existants et certaines sont autoagglutinables. Des souches polyagglutinables sont

parfois mises en évidence, mais il est alors souvent possible de mettre en évidence un sérotype dominant.

Ces sérogroupes sont très utiles pour le diagnostic et pour les études épidémiologiques. Leur étude a permis la mise au point des vaccins anti-méningocoques A et C. Le polysaccharide du groupe B est peu immunogène et ne permet pas le développement d'une immunité protectrice.

Dans les M.C.S. en France : le sérotype B est prédominant, le sérotype C est moins fréquent, A et Y sont rares. X et 29E sont exceptionnellement isolés.

Les sérogroupes de *N. meningitidis* ont été subdivisés en sérotypes. Ceux-ci correspondent à des spécificités antigéniques portées par 5 protéines de la membrane externe. Ces sérovars sont définis par l'utilisation d'anticorps monoclonaux donnant le "profil antigénique des souches".

Exemple : c ; 2a ; P1.2 (Sérotype C ; sérotype 2a, sous-type P1.2).

Les sérotypes 2a et 2b sont fréquemment associés à des manifestations pathologiques.

Il existe une autre classification utilisant les profils électrophorétiques de 13 enzymes métaboliques ("Multilocus enzyme genotype"). Cette méthode permet également une très fine discrimination des souches de méningocoque. Certains profils électrophorétiques (ET) sont observés chez des souches virulentes. Par exemple, des souches ET-5 ont été suivies dans plusieurs pays européens depuis 1975.

F - Immunité

Le portage permet le développement d'une immunité protectrice. Les adultes sont en général protégés et la maladie frappe l'enfant et l'adulte jeune. Avant 3 à 6 mois, le nourrisson est protégé par les anticorps maternels. Cette immunité est spécifique de groupe.

G - Pouvoir pathogène expérimental

Aucun animal de laboratoire n'est spontanément sensible au méningocoque :

- singe : une méningite est observée après injection intrathécale
- souris : l'injection péritonéale avec de la mucine permet le développement d'une infection
- rat nouveau-né : une injection intra-péritonéale provoque l'apparition d'une septicémie et d'une méningite.

Ces modèles ne renseignent pas sur la physiopathologie des infections mais ils sont utilisés pour les études de virulence des souches ou de protections passives.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Les prélèvements

En raison de la **fragilité** de la bactérie ils doivent être transportés sans délai et à l'abri du froid au laboratoire.

Chez l'homme sain :

- prélèvements pharyngés
- prélèvements ano-génitaux (cf. gonocoque)

Chez le malade :

- ponction lombaire. C'est toujours un examen **d'urgence**.
- hémoculture, après désinfection soigneuse de la peau.

— éventuellement ; ponction de liquide articulaire, aspiration transtrachéale pour le diagnostic de pneumonie à méningocoque. Chez le malade suspect d'infection à méningocoque, *le diagnostic peut être orienté cliniquement (purpura), mais il ne sera affirmé que par la bactériologie.*

B - Examen du LCR

— Aspect macroscopique

Le LCR est en général trouble. Il peut rester clair si la ponction lombaire a été faite précocement avant la survenue d'une réaction cellulaire importante.

— Cytologie

La méningite purulente se caractérise par la présence de plusieurs centaines d'éléments cellulaires par mm³, en prédominance des **polynucléaires**. Cette réaction cellulaire s'accompagne d'une hyperprotéïnorachie et d'une hypoglycorachie.

— Examen du culot de centrifugation (15 minutes à 2 500 g).

Il montre des diplocoques à Gram (-) intra-cellulaires (dans les polynucléaires) ou extra-cellulaires.

L'examen de la lame doit être soigneux car les germes peuvent être en petit nombre. Dans environ un tiers des méningites cérébro-spinales il n'est pas vu de germes à l'examen direct.

— Mise en culture

Elle doit être faite sur des boîtes réchauffées à 37°C,ensemencées abondamment (plusieurs gouttes de LCR).

Les milieux de choix sont la gélose au sang et la gélose chocolat incubées dans une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂. L'ensemencement d'un bouillon peut avoir pour intérêt de diluer des antibiotiques éventuellement présents dans le LCR.

— Recherche d'antigènes dans le surnageant de centrifugation

Le diagnostic rapide (agglutination de particules de latex sensibilisées, ou contre-immuno-électrophorèse) permet une réponse (méningocoque A, B ou C, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*) dans certaines méningites décapitées par les antibiotiques.

— L'hémoculture doit être réalisée systématiquement. Un cocci à Gram (-) dans une hémoculture ou un LCR lors d'un tableau infectieux sévère est presque toujours un méningocoque.

Le lendemain le diagnostic présomptif sera obtenu en agglutinant les colonies suspectes (oxydase (+)) avec les immunosérums spécifiques. Ce diagnostic sera confirmé par l'étude des caractères biochimiques.

C - Recherche d'un portage

La recherche de méningocoque chez un sujet contact se fera par ensemencement d'un frottis rhinopharyngé sur milieu sélectif. Les colonies suspectes seront identifiées comme ci-dessous.

D - Examen des colonies suspectes.

1. Diagnostic différentiel

Il pose peu de problèmes.

— les colonies poussent sur VCF

— ONPG (-) ; diagnostic différentiel avec *N. lactamica*.

- γGT(+)

- acidification du glucose et du maltose (les souches maltose (-) sont exceptionnelles)
- agglutination par immunsérum spécifique.

2. Agglutination sur lame

C'est la technique usuelle de détermination. L'utilisation d'une culture de 24 heures sur gélose au sang (ou Mueller Hinton) est préférable. Si aucune agglutination n'est observée une suspension épaisse est chauffée au bain-marié (100°C) pendant 10 mn et on refait l'essai d'agglutination.

Cette agglutination doit être rapide, en quelques secondes. Il ne faut pas tenir compte des agglutinations tardives. Les sérums spécifiques des groupes A, B, C, 29E, W 135, X, Y, Z sont commercialisés.

Le typage des antigènes protéiques du méningocoque est réservé aux centres spécialisés.

VI - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Elle est semblable à celle du gonocoque, mais sans augmentation de résistance avec les années, sauf pour les sulfamides.

Les CMI sont plus élevées que celles observées avec le gonocoque mais le méningocoque reste sensible à la pénicilline (CMI = 0,25 mg/1). Un faible pourcentage de souches à sensibilité diminuée à la pénicilline a été observé, mais celles-ci sont exceptionnelles en France.

Par contre, la sensibilité aux sulfamides a diminué et actuellement 50 % des souches appartenant aux groupes B, C et 60 à 80 % de celles appartenant au groupe A sont résistantes. Ces souches restent sensibles au cotrimoxazole. Aussi l'intérêt des sulfamides dans la prophylaxie de la méningite est faible.

Une souche productrice de bêta-lactamase a été décrite ; elle a été isolée dans un frottis de col, associée à une souche de gonocoque productrice de bêta-lactamase. Le transfert du plasmide au méningocoque est vraisemblable ; cette observation est restée unique.

VII - TRAITEMENT

A - Traitement curatif

pénicilline 30 MU/jour pour les adultes
 8 MU/jour pour les enfants
 ou ampicilline 12-15 g/jour pour les adultes
 200-300 mg/kg/jour pour les enfants
 en perfusion continue pendant 15 jours.

L'utilisation de probénécide augmente la concentration intra-rachidienne et ralentit l'élimination de l'antibiotique.

On peut utiliser une céphalosporine dite de 3^e génération (céfotaxime...), le thiamphénicol (pays en voie de développement)...

Les traitements adjuvants sont la réhydratation, l'alimentation parentérale, les anticonvulsivants (nourrisson).

Dans les formes gravissimes (état de choc, CIVD...) une réanimation médicale intensive est nécessaire.

Le traitement antibiotique par voie intra-fhécale est exceptionnel et réservé aux formes avec faible réaction cellulaire.

B - Traitement prophylactique

Il se fait dans l'entourage immédiat du malade. En milieu fermé (caserne, lycée) le risque de contamination est élevé. En milieu ouvert, il est inutile sauf pour rassurer l'entourage.

La spiramycine était l'antibiotique recommandé par les autorités sanitaires. La rifampicine est aujourd'hui préférée (voir circulaire ci-dessous).

La vaccination ne concerne que les souches des groupes A et C. Elle consiste en une injection de 50 µg de polyoside purifié qui induisent l'apparition d'anticorps protecteurs. Elle a permis d'enrayer l'épidémie au Brésil de 1973 en 6 jours. La vaccination est efficace pendant 2 ans, elle n'entraîne pas de réaction. Le vaccin se conserve 12 mois à 4°C.

Des vaccins contre le méningocoque du sérotype B sont actuellement utilisés à Cuba et sont à l'étude en Amérique du Sud. Dans ces pays surviennent depuis peu des

épidémies dues à ce sérotype qui présentent les mêmes caractéristiques que celles dues au sérotype A ou C.

Ces vaccins utilisent des complexes protéiques de la membrane externe et étant donné la multiplicité des sérovars, les sérotypes les plus fréquemment isolés dans la région à vacciner doivent être utilisés. La protection fournie semble satisfaisante.

ANNEXE

En raison du climat souvent émotionnel qui entoure les cas de méningite cérébro-spinale et des implications médico-légales possibles, nous reproduisons ci-dessous la circulaire relative à l'attitude à observer en présence de cas de méningite.

PROPHYLAXIE DES INFECTIONS À MÉNINGOCOQUE

Circulaire DGS/PGE/1 C du 5 février 1990

Le méningocoque est une bactérie responsable d'environ 30 % des méningites bactériennes en France. La mortalité de cette infection est loin d'être négligeable malgré la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques.

Une prophylaxie bien conduite dans l'entourage d'un cas doit permettre d'éviter la survenue de cas secondaires. Cependant, l'épidémiologie de cette infection est souvent mal connue et les réactions naturelles d'angoisse provoquées par cette maladie dans la population peuvent entraîner des difficultés lors de l'application de ces règles de prophylaxie. Cette situation conduit parfois à des prescriptions inutiles et coûteuses. À la lumière de l'analyse des données de surveillance et d'un travail bibliographique sur l'épidémiologie et la prévention des infections à méningocoque, il a paru nécessaire de procéder à une mise à jour de la conduite à tenir face à un cas d'infection à méningocoque.

La présente circulaire, qui se substitue à celles du 28 janvier 1980 et du 13 février 1987, est un document technique destiné d'une part, aux médecins-inspecteurs de la santé qui sont amenés à prendre et à expliquer sur le terrain les mesures de prophylaxie et d'autre part, aux praticiens hospitaliers qui prennent en charge les malades.

Ce document comporte trois parties :

- les deux premières parties exposent les arguments qui permettent de justifier les mesures recommandées : épidémiologie des infections à méningocoque et principes de la prévention des cas secondaires;
— la troisième partie détaille la conduite à tenir en pratique chez le malade et chez les sujets contacts du malade. Par rapport aux recommandations antérieures, cette circulaire apporte trois nouveaux éléments : la nécessité de donner un traitement antibiotique prophylactique au malade à la sortie de l'hôpital, la modification de l'antibiotique proposé en chimioprophylaxie et enfin une meilleure définition de la conduite à tenir en milieu scolaire. Je vous demanderais de bien vouloir diffuser aux médecins de Santé publique et aux praticiens hospitaliers ce document qui devrait permettre de mieux affronter dans l'avenir des situations parfois difficiles à gérer.

I. ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À MÉNINGOCOQUE

La méningite à méningocoque et les méningococcémies sont des maladies à déclaration obligatoire (décret n° 86-770 du 10-6-1986). Les critères de déclaration sont les suivants : isolement de *N. meningitidis* dans le LCR et/ou le sang ou présence d'antigènes solubles de cette bactérie dans le LCR, le sang ou les urines.

1. Incidence. - Depuis 1945, l'incidence des infections à méningocoque déclarées en France connaît des fluctuations entre 1 et 4 pour 100 000 habitants. Depuis 1982, elle baisse de façon régulière et constante pour atteindre 1 pour 100 000 habitants en 1988.

Cette incidence est très différente selon l'âge. Les taux d'incidence par tranche d'âge exprimés pour 100 000 sont les suivants : < 1 an : 8,2; 1-4 ans : 3,6; 5-9 ans : 2,0; 10-14 ans : 0,8; 15-19 ans : 1,4; 20 ans et plus : 0,2.

2. Tendances annuelles, épidémies et saisonnalité. — Il semble que l'incidence des infections à méningocoque suive un rythme avec des pics survenant tous les dix ans environ. Des épidémies locales, régionales, voire nationales (Brésil) peuvent apparaître. Les sérogroupes A et C sont le plus fréquemment responsables de ces épidémies.

Les variations saisonnières en France montrent une fréquence accrue du mois de février au mois d'avril, excepté en 1988 où le pic de fréquence a eu lieu en décembre.

3. Sérogroupes. - Le sérotype est basé sur l'identification immunologique de polysides capsulaires du méningocoque. Le sérotype B est prédominant en France et représente 60 % des cas d'infection à méningocoque. Cependant, de nets changements dans la répartition par sérotype des cas sont survenus depuis 1975. Le sérotype B connaît depuis 1980 une diminution progressive. Le sérotype C est en augmentation lente et est en cause maintenant dans presque 1 cas sur 3.

4. Sérotypes et sous-types. — Indépendamment du sérotype, il existe des marqueurs antigéniques dont l'intérêt épidémiologique est d'identifier avec précision une souche donnée et d'affirmer donc la similitude des souches lors des foyers de cas groupés. Cinq protéines de membrane externe permettent de définir des sérotypes et des sous-types. Ces sérotypes et sous-types sont identiques pour les sérotypes B, C, Y, W 135. En France, les sérotypes prédominants sont le 4, 1a, 14, 15 pour le sérotype B et 2a pour le C. Les sous-types prédominants sont le P 1.2, P 1.6, P 1.7. Une formule antigénique, véritable « carte d'identité » de la souche, peut alors être définie en combinant sérotype et sous-type, par exemple : C : 2a : P 1.2. Plusieurs études ont confirmé la virulence particulière du sérotype 26 pour le sérotype B et des sérotypes 2, 15, 16 pour les sérotypes B et C.

5. Létalité et facteurs pronostiques. — Le taux de létalité des infections à méningocoque en France est relativement constant depuis 1985 et varie entre 8 et 10 %.

Le taux de létalité dépend :

- du sérotype : il est plus important pour le sérotype C et plus faible pour le sérotype A;
- du sérotype : il existe une plus forte mortalité pour les méningocoques B type 2 b que les autres types de méningocoque B;
- d'autres facteurs : la survenue d'une septicémie à méningocoque et/ou d'un *purpura fulminans*, un âge inférieur à 1 an ou supérieur 50 ans sont des facteurs de risque de mortalité.

6. Portage rhinopharyngé et infection. — La transmission du méningocoque se fait essentiellement par les sécrétions rhinopharyngées émises lors de la toux ou de la parole. La bactérie se loge alors sur la paroi postérieure du rhinopharynx. L'acquisition du méningocoque est asymptomatique ou entraîne une simple pharyngite non spécifique. Dans la grande majorité des cas, le sujet s'immunise en fabriquant des anticorps protecteurs et devient porteur sain. Dans un petit nombre de cas, l'infection diffuse par voie sanguine et provoque une infection systémique : méningite ou méningococcémie.

a. Rôle du portage

- *Immunsation.* — Chez les sujets porteurs sains, 92 % développent des anticorps contre la souche portée et 80 % contre au moins une autre souche virulente par immunisation croisée. Ces anticorps atteignent un taux assurant une protection environ 7 à 14 jours après l'acquisition de la souche (maximum 1 mois). Avant l'âge de 6 mois, l'enfant est habituellement protégé par les anticorps maternels. La majorité des adultes a rencontré le méningocoque et possède des anticorps assurant sa protection contre les souches les plus fréquentes. Le nombre de sujets non protégés est maximal vers l'âge de 1 à 3 ans, expliquent la plus grande fréquence de cas à cet âge. Grâce à l'immunisation croisée, les souches peu pathogènes ou pathogènes et peu virulentes pourraient jouer un rôle important dans l'immunisation des sujets contre des souches plus virulentes appartenant à d'autres sérogroupes. De même, l'acquisition de *Neisseria lactamica*, souche très rarement pathogène, pourrait par le même phénomène protéger le sujet contre *N. meningitidis*. L'acquisition de *N. lactamica* se fait pendant l'enfance, et le taux de portage diminue quand l'âge augmente (21 % de sujets porteurs à 18 mois, puis diminution progressive jusqu'à 2 % à 14-17 ans).
- *Infection systémique.* — Le facteur de risque de développement d'une infection systémique n'est pas le statut de porteur mais l'acquisition récente du portage. Les sérogroupes A, et dans une moindre mesure C, ont une virulence plus importante que le B et sont plus rarement retrouvés chez les porteurs sains.
- *Durée du portage, délai entre l'acquisition du méningocoque et l'apparition de la maladie.* — La durée du portage est longue : 5 à 15 semaines, voire 9 à 16 mois dans certains cas. Les infections systémiques se développent dans les 7 jours suivant l'acquisition du portage. Les sujets porteurs de la bactérie depuis plus de 7 jours ont généralement développé des taux suffisants d'anticorps protecteurs.

b. Études de portage. — Les études réalisées sur le taux de portage trouvent des résultats assez différents d'une étude à l'autre probablement en raison de techniques différentes de prélèvement. En effet, *N. meningitidis* est retrouvée uniquement sur la paroi postérieure du rhinopharynx et non sur les amygdales. Le taux de portage d'une souche chez les sujets asymptomatiques dépend étroitement de sa virulence et de sa transmissibilité.

— *Taux de portage de la population générale.*— Ce taux est variable selon l'âge : d'environ 10 % à l'âge de 0 à 14 ans, il augmente à un taux de 30 % à 15-20 ans puis diminue ensuite.

— *Taux de portage en milieu familial.* — Le taux de portage varie selon qu'il y a eu un cas de méningococcie dans la famille ou non. Le taux de portage dans une famille sans cas varie de 2 à 18 %. Ce taux passe à 10-50 % si un cas survient dans la famille.

Une fois sur deux, le sujet introduisant le méningocoque dans la famille est un adulte masculin. Les contacts non familiaux des cas (amis, voisins immédiats), ainsi que les sujets contacts des porteurs sains (contacts secondaires) ont un taux de portage de la souche non significativement différent de celui de la population générale.

— *Taux de portage en milieu scolaire.* — Le taux de portage en milieu scolaire, en dehors de la survenue de cas dans l'école est d'environ 23 %. Lors de la survenue d'un cas dans une école, le taux de portage de l'ensemble de l'établissement n'augmente pas significativement. Dans les classes des cas, le taux de portage est plus important (environ 40 %). Les élèves assis près d'un cas à la cantine ont un risque plus important d'acquérir la bactérie. Une étude a trouvé un taux de portage plus élevé dans les classes dans lesquelles les élèves sont assis à moins d'un mètre l'un de l'autre que dans le reste de l'école.

— *Taux de portage en milieu militaire.* — Lors du début du service, le taux de sujets porteurs varie de 0 à 33 %, il augmente avec les semaines d'entraînement pour atteindre environ 80 % après 5 semaines.

7. Facteurs favorisant la transmission du méningocoque. - Plusieurs

facteurs pouvant faciliter la transmission du méningocoque ont été mis en évidence. Certains sont bien établis, d'autres prêtent encore à discussion :

— la promiscuité est un facteur bien connu pour favoriser la transmission de la bactérie. La contagion est favorisée, dans une famille, si le nombre de personnes est élevé dans un espace restreint et si plusieurs personnes dorment dans la même pièce;

— les sujets exposés aux sécrétions oropharyngées du malade (« flirts » ou partenaires sexuels) ont un risque plus élevé d'acquérir la bactérie;

— des conditions socio-économiques défavorables sont également un facteur de risque de transmission du méningocoque, probablement par une promiscuité plus étroite entre les sujets ;

— il existe également une incidence plus élevée en zone urbaine qu'en zone rurale;

— une infection virale des voies respiratoires est vraisemblablement un facteur de risque d'acquisition du méningocoque, mais ce point reste discuté. Il existe une relation entre les courbes d'incidence des syndromes grippaux et des infections à méningocoque, en dehors d'un effet de saisonnalité. Les viroses respiratoires pourraient favoriser l'émergence d'une méningococcie de deux façons : soit en favorisant l'acquisition du méningocoque par transmission conjointe lors de la toux, soit en favorisant le passage du porteur sain de méningocoque à l'infection proprement dite, par fragilisation du terrain.

8. Épidémiologie des cas secondaires.

a. Définition d'un cas secondaire. — Un cas secondaire se définit comme un cas d'infection à méningocoque survenant chez un sujet contact d'un cas avec un délai supérieur à 24 heures. Les cas secondaires sont rares : 3 % des cas de méningococcie en France en 1987-1988. Les cas groupés survenant dans un délai inférieur à 24 heures sont définis comme des cas coprimaires et représentent 3 % de l'ensemble des méningococcies en France.

b. Taux d'attaque secondaire en milieu familial et scolaire. — Dans les familles où au moins un cas est survenu, le taux d'attaque secondaire s'échelonne entre 2 et 4/1000 en période d'endémie et 60/1000 en période épidémique. Le risque de survenue d'un cas est dans ces familles de 500 à 800 fois supérieur au taux d'incidence de la population générale en période non épidémique.

Le risque est multiplié par 76 dans les crèches et 23 dans les écoles maternelles. Le risque n'a été évalué pour les écoles primaires et secondaires que lors de l'épidémie brésilienne : les classes des cas n'avaient pas un taux d'incidence plus important que la population générale.

c. Délai de survenue des cas secondaires. — Près de 60 % des cas secondaires apparaissent dans la semaine suivant le cas index, et 87 % dans les 15 jours. De rares cas peuvent apparaître de 3 à 8 mois après le cas index, mais le lien avec le cas index peut être indirect par l'intermédiaire de porteurs sains.

II. PRINCIPES DE LA PRÉVENTION DES CAS SECONDAIRES

1. Populations cibles

La prophylaxie des infections à méningocoque a deux objectifs :

- empêcher l'acquisition de la bactérie et/ou l'infection chez les sujets en contact étroit avec un cas;
- rompre la chaîne de transmission d'une souche virulente en empêchant sa diffusion secondaire à une population susceptible (jeunes enfants) par des porteurs sains.

/ Pour répondre à ces objectifs, 3 groupes cibles peuvent être individualisés :

- les sujets vivant au **domicile du malade** ou ayant dormi dans la même pièce que lui dans les 10 jours précédant l'hospitalisation;
- les sujets ne vivant pas au domicile du malade mais ayant eu des **contacts proches et répétés** avec le cas dans les 10 jours précédant l'hospitalisation ;
- les **collectivités de jeunes enfants** (crèches, maternelles).

De plus, les cas eux-mêmes devront faire l'objet d'une chimioprophylaxie après le traitement curatif administré à l'hôpital. En effet, ce traitement s'est révélé inefficace pour éliminer le portage rhinopharyngé, et ces sujets risquent de transmettre ultérieurement une souche virulente à des sujets contacts.

La prophylaxie doit être appliquée le plus rapidement possible après le diagnostic car son intérêt diminue avec le temps. Idéalement, elle doit être entreprise le jour même ou le lendemain du diagnostic. Il s'agit d'une véritable « urgence préventive ».

2. Chimioprophylaxie

L'antibiotique choisi doit être efficace sur *N. meningitidis* et en doit pas créer d'émergence de souches résistantes. Il doit atteindre des concentrations salivaires supérieures à la Concentration Minimale Inhibitrice pour *N. meningitidis*. Son action doit être rapide et prolongée dans le temps. Il ne doit pas décapiter une éventuelle méningite. Il doit être bien toléré et avec peu de contre-indications. Il doit être d'un emploi pratique avec un traitement de courte durée.

La pénicilline, l'ampicilline et l'érythromycine n'atteignent pas des concentrations locales suffisantes et sont inefficaces sur le portage.

De nombreuses souches de *N. meningitidis* sont résistantes aux *sulfamides*, qui sont donc contre-indiqués dans cette indication.

La *minocycline* entraîne des effets secondaires vestibulaires dans de nombreux cas et est contre-indiquée chez le jeune enfant et la femme enceinte.

Il n'existe pas un recul suffisant pour évaluer convenablement des antibiotiques plus récents tels que la *ceftriaxone* ou la *ciprofloxacine*.

La *spiramycine* atteint des concentrations salivaires satisfaisantes. Elle a très peu de contre-indications et d'effets secondaires, mais la durée du traitement est relativement longue (5 jours). Cet antibiotique ne passe pas la barrière hémato-méningée. La spiramycine est efficace pour réduire le portage à court terme (15 % des sujets restent porteurs 2 jours après la fin du traitement), mais il existe une réacquisition importante puisque 12 jours après la fin du traitement, 41 % des sujets sont porteurs (ce taux est de 75 % pour les sujets hébergeant un méningocoque C). Il n'existe pas d'essai clinique satisfaisant permettant d'affirmer qu'elle élimine le portage rhinopharyngé après un délai de plus de 15 jours après son administration.

Deux cas d'infections à méningocoque après une chimioprophylaxie correctement prise ont été rapportés en France.

La *rifampicine* s'est révélée efficace, dans des essais cliniques rigoureux, pour réduire le portage (75 % à 98 % de succès, selon les études, une semaine après le traitement). Le taux de réacquisition est faible : environ 10% au bout de 11 mois. La concentration salivaire est suffisante pour éliminer la bactérie. Il existe très peu d'effets secondaires aux doses employées dans cette indication. Son emploi est peu contraignant (2 jours) et les contre-indications sont rares, surtout chez les moins de 18 ans qui forment la majorité des sujets à risque. La rifampicine est largement utilisée dans les pays anglo-saxons depuis les années 70. Malgré cette large utilisation, l'apparition de souches résistantes après chimioprophylaxie ne paraît pas avoir d'incidence pratique. L'émergence de souches résistantes *in vitro* après traitement prophylactique existe chez 1 à 10% des sujets, mais seulement 0,15 % des souches isolées à partir de malades, de 1975 à 1980 aux États-Unis, se sont révélées résistantes à la rifampicine. Son utilisation comme traitement de la tuberculose a été un argument contre son emploi comme moyen prophylactique. Cependant, il n'a jamais été démontré qu'une prescription de courte durée puisse induire l'apparition de BK résistants. De plus, le risque de prescription de rifampicine à but prophylactique chez un tuberculeux dont le diagnostic n'aurait pas été fait, a été estimé aux États-Unis à environ 1 sur 100 millions.

3. Vaccination

Un vaccin anti-méningocoque A+C est commercialisé en France. Le vaccin est strictement spécifique des sérogroupes contre lesquels il est conçu. Il n'existe pas de vaccin contre le méningocoque B. L'injection du vaccin est suivie par une ascension du taux d'anticorps atteignant un seuil protecteur en 5 à 8 jours. La vaccination s'est révélée efficace pour une protection individuelle chez environ 90 % des sujets vaccinés.

Le vaccin est efficace dès l'âge de 3 mois pour le séro groupe A et à partir de 1 an pour le C. La protection optimale pour les deux sérogroupes est obtenue après l'âge de 18 mois et augmente avec l'âge. La durée de protection est assez faible pour les deux sérogroupes (3 ans environ, et moins chez les enfants de moins de 18 mois).

Les **effets secondaires** du vaccin sont rares (2 %) et consistent en un érythème au point d'injection et/ou une fièvre modérée. Il n'existe **aucune contre-indication** au vaccin, y compris pendant la grossesse.

Ht. ACTUALISATION DES RECOMMANDATIONS FRANÇAISES

1. Conduite à tenir chez le malade :

— le malade doit être hospitalisé en urgence dès la suspicion du diagnostic;
 — à l'hôpital, les examens offrant le maximum de chance d'isoler la bactérie **et** d'identifier le séro groupe doivent être effectués : ponction lombaire, hémocultures, prélèvement au niveau du rhinopharynx postérieur (si possible avant antibiothérapie), recherche d'antigènes solubles dans le L.C.R., le sang et les urines. En cas de décès avant la ponction lombaire, celle-ci doit être pratiquée en *post mortem* pour affirmer le diagnostic et identifier le séro groupe;

— le sérogroupage de la souche doit être effectué sans exception dès l'isolement de la bactérie. La souche doit être systématiquement envoyée pour sérotypie au Centre national de référence du méningocoque (Dr Riou, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, tél.:45688330);

— le cas doit être déclaré par téléphone au médecin de la D.D.A.S.S. dès l'isolement du méningocoque. Le sérotype doit également être communiqué par téléphone au médecin de la D.D.A.S.S. dès son obtention. Le questionnaire de déclaration doit être soigneusement rempli et adressé à la D.D.A.S.S., juste avant la fin de l'hospitalisation (ou après le décès);

— à la suite de l'antibiothérapie à but curatif, le malade doit bénéficier d'un traitement antibiotique prophylactique selon les mêmes modalités que pour les sujets contacts (voir ci-dessous). Il pourra réintégrer une collectivité scolaire dès la fin de ce traitement.

2. Conduite à tenir chez les sujets contacts du malade

a. Définition des sujets contacts

Les mesures de prophylaxie doivent être proposées aux sujets contacts définis de la façon suivante (récapitulée dans l'organigramme joint en annexe) :

— *En ville* :

— personnes vivant au domicile du malade ou ayant dormi dans la même pièce que le malade dans les 10 jours précédant l'hospitalisation;

— personnes exposées aux sécrétions oropharyngées du malade dans les 10 jours précédant son hospitalisation : camarades de jeux habituels du malade, « flirts » ou partenaires sexuels d'un cas adolescent ou adulte, sujets ayant partagé une soirée dansante avec le malade;

— personnes ayant pratiqué des manœuvres de réanimation impliquant un contact étroit avec les sécrétions oropharyngées du malade (bouche-à-bouche, intubation trachéale).

— *Dans les pouponnières, crèches et établissements d'enseignement ou d'éducation publiques ou privés*

Dans les établissements scolaires, l'arrêté du 3 mai 1989 précise que les mesures de prophylaxie sont prises à l'initiative de l'autorité sanitaire représentée par la D.D.A.S.S. Dans les crèches et les pouponnières, les mesures de prophylaxie sont prises par la D.D.A.S.S. en liaison avec le médecin responsable de l'établissement. En pratique, les parents des enfants concernés par la prophylaxie seront destinataires d'une note recommandant une consultation médicale et rappelant les mesures à prendre pour leur enfant.

Pouponnières, crèches, écoles maternelles

Étant donné la promiscuité étroite existant dans ces établissements et l'âge des enfants, les mesures de prophylaxie seront proposées à la fois aux enfants et au personnel. Aucun nouvel arrivant ne sera admis avant la fin du traitement.

Écoles primaires, collèges, lycées

On peut distinguer trois circonstances :

— *survenue d'un seul cas* : la prophylaxie sera proposée exclusivement aux sujets ayant eu un contact fréquent avec le malade : camarades habituels de jeux ou d'étude, voisins immédiats habituels de réfectoire, au maximum à toute la classe;

— *survenue de plusieurs cas dans /a même classe* : la prophylaxie sera proposée à l'ensemble de la classe et ne devra pas être étendue au reste de l'établissement;

— *survenue d'autres cas dans l'établissement* : lors de la survenue d'un deuxième cas dans une classe différente de celle du premier malade, les règles de prophylaxie ne seront pas étendues à l'ensemble de l'établissement et concerneront uniquement les élèves des 2 classes et les camarades habituels de jeux, d'étude ou les voisins immédiats habituels de réfectoire des malades.

Les mesures de prophylaxie ne seront proposées à l'ensemble de l'établissement que lorsque 3 cas ou plus surviennent dans cet établissement dans

au moins 2 classes différentes, avec un intervalle maximal d'un mois entre le premier et le dernier cas.

Internats

Outre les sujets définis ci-dessus, les voisins de dortoir du malade seront concernés par des mesures prophylactiques.

Universités

Une prophylaxie sera proposée exclusivement aux camarades habituels du malade.

- *Dans les collectivités d'adultes*

Les règles de prophylaxie seront recommandées exclusivement en cas de survenue d'au moins un cas secondaire dans la collectivité et ne devront s'appliquer qu'aux sujets ayant des contacts fréquents avec l'un des cas.

b. Règles de prophylaxie dans l'entourage d'un cas

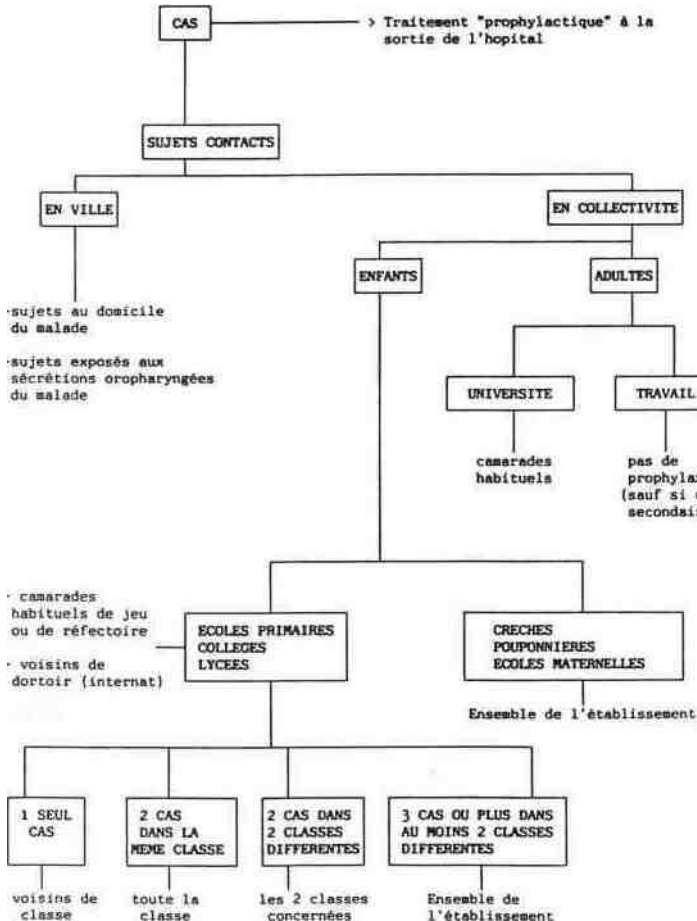
Les mesures prophylactiques sont d'autant plus efficaces qu'elles sont instituées rapidement. Elles ne présentent plus qu'un intérêt limité si elles sont prises plus de 8 jours après le diagnostic.

- *Chimioprophylaxie*

Pour les sujets contacts définis ci-dessus, une Chimioprophylaxie sera proposée selon le schéma suivant :

- **rifampicine** pendant 2 jours à la dose suivante :
 - adulte : 600 mg deux fois par jour,
 - enfant de 1 mois à 12 ans : 10 mg/kg deux fois par jour,
 - enfant de moins de 1 mois : 5 mg/kg deux fois par jour.

PERSONNES CONCERNÉES PAR LES MESURES DE PROPHYLAXIE



Les contre-indications sont les suivantes : grossesse, maladie hépatique sévère, alcoolisme, porphyries, hypersensibilité à la rifampicine.

Une **précaution d'emploi** concernant le port de lentilles de contact est à signaler en raison du risque de coloration définitive de ces lentilles.

Les **effets secondaires** sont mineurs : coloration orangée des urines et de la salive; interaction avec les contraceptifs oraux;

- en cas de contre-indication à la rifampicine : **spiramycine** pendant 5 jours à la dose suivante :
 - adulte : 3 millions d'U.I. deux fois par jour,
 - enfant : 75 000 U.I./kg deux fois par jour.

- *Vaccination*

Quand un méningocoque du groupe A ou C est isolé chez le malade, dès lors que le sérotype est connu, une vaccination sera proposée conjointement à la chimioprophylaxie, pour les sujets contacts :

- âgés de 3 mois ou plus pour le méningocoque A;
- âgés de 1 an ou plus pour le méningocoque C.

Il n'y a pas de contre-indication à cette mesure, y compris lors de la grossesse. La vaccination ne se substitue, en aucun cas, à la chimioprophylaxie dont elle relaie l'effet protecteur.

- *Information et surveillance médicale*

Les sujets contacts et les sujets appartenant à la même collectivité que le malade devront être informés sur la maladie et les mesures à prendre. Une surveillance médicale des sujets contacts sera instituée pendant les 15 jours suivant l'application des mesures prophylactiques. Les sujets contacts et les sujets appartenant à la même collectivité que le malade devront consulter un médecin si des symptômes évocateurs apparaissent.

- *Mesures inutiles et à éviter*

La désinfection rhinopharyngée, le prélèvement rhinopharyngé des sujets contacts sont inutiles. L'éviction scolaire ou l'isolement des sujets contacts n'est pas recommandé. Étant donné la fragilité du méningocoque, la désinfection ou la fermeture d'un établissement, y compris scolaire, sont des mesures tout à fait inutiles et injustifiées.

L'extension des mesures de prophylaxie à des populations plus larges que celles définies ci-dessus doit être évitée. Cette extension n'a pas de justification épidémiologiquement démontrée tout en représentant un coût pour la collectivité.

Ces recommandations ont reçu l'approbation du Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section « Prophylaxie des maladies ».

Vous voudrez bien me faire part des difficultés rencontrées dans l'application de cette circulaire.

Le directeur général de la Santé,

Pr J.-F. GIRARD

source : Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire n° 7/1990

LES AUTRES NEISSERIA

Ce sont des germes commensaux des voies aériennes supérieures de l'homme et de l'animal qui sont parfois responsables d'infections pulmonaires et de septicémies, souvent sur des terrains débilisés.

1 - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES (Tableau I)

Ce sont des cocci à Gram (-) associés en diplocoques ou en tétrades, à métabolisme oxydatif.

N. elongata est un bacille à Gram (-) qui est rattaché aux *Neisseria* sur des arguments génétiques et biochimiques.

Les *Neisseria* cultivent à 20°C et peuvent être isolés sur les milieux usuels. Elles produisent un verdissement de la gélose au sang. Deux espèces poussent sur milieu sélectif (résistance à la colimycine) et acidifient le glucose et le maltose et peuvent poser un problème de diagnostic différentiel avec *N. meningitidis* : *Neisseria lactamica* est la seule espèce qui acidifie le lactose et *N. polysacchareae* ne possède pas de γ GT et synthétise des polysaccharides sur milieu saccharose. *N. cinerea* peut être isolé sur milieu sélectif mais ne pousse pas au repiquage sur ce milieu. Par ailleurs, seul un petit nombre de souches parmi les autres espèces de *Neisseria* possède cette caractéristique.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

Ces espèces sont exceptionnellement responsables d'infections caractérisées. Les infections broncho-pulmonaires sont les plus fréquentes et permettent d'isoler *N. perflava*, *N. sicca*, *N. mucosa*.

Des septicémies ont été décrites, parfois avec des endocardites (*N. sicca* le plus souvent) ; les méningites sont rares.

III - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Plusieurs types de prélèvements peuvent permettre l'isolement de ces *Neisseria* :

- frottis de nez et de gorge
- crachats
- liquides pleuraux
- hémocultures
- éventuellement LCR.

Le diagnostic bactériologique ne devrait pas poser de problème.

- A l'examen direct : présence de cocci à Gram (-) (si le prélèvement est purulent, présence de diplocoques intra-cellulaires).
- L'aspect en culture est utile pour le diagnostic (pigment, hémolyse, colonies sèches ou muqueuses,...).

Les caractères biochimiques permettant l'identification sont peu nombreux : ONPG, acidification des sucres, réduction des nitrates, γ Gt. Le diagnostic différentiel avec le méningocoque ne se pose généralement pas.

IV - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Ces espèces résistantes aux pénicillines M et aux lincosamines, sont en général sensibles aux mêmes antibiotiques que les cocci à Gram (+).

TABEAU 1
DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE SIMPLIFIÉ DES NEISSERIA ET BRANHAMELLA

GENRES et ESPÈCES	PRINCIPAUX CARACTÈRES										AUTRES CARACTÈRES ET REMARQUES
	Croissance sur milieux sélectifs	Pigments	Hydrolyse des glucides				ONPG	Tributyline	γGT	Synthèse poly- saccharides	
			Glu	Mal	Fru	Sac					
<i>I. Neisseria</i>											
<i>N. gonorrhoeae</i>	+		+								Importance de l'antibiogramme Recherche de p-lactamase
<i>N. meningitidis</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	Agglutination groupes A, B, C, X, Y, Z 29 E, W135
<i>N. polysacchariifera</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	
<i>N. mucosa</i>	-	sauf heidelb	+	+	+	+	-	-	+	+	Respiration des nitrates (dégagement d'azote à partir de N03)
<i>N. subflava</i> var. <i>subflava</i> var. <i>flava</i> var. <i>perflava</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	Nécessité d'une étude attentive de la morphologie des colonies. Réduit les nitrites, pas les nitrates.
<i>N. sicca</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	Réduit les nitrites, pas les nitrates.
<i>N. flavescens</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Rarissime
<i>N. lactamica</i>	+	(léger)	+	+	-	-	+	-	-	-	Diagnostic différentiel important avec le méningocoque
<i>II. Branhamella</i>											
<i>B. catarrhalis</i>								+			Réduit les nitrates.

BIBLIOGRAPHIE

Revue générale : KNAPP J.S., « Historical perspectives and identification of *Neisseria* and related species ». *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 415-432.

Neisseria gonorrhoeae

BRITIGAN B.E., COHEN M.S., SPARLING P.F., « Gonococcal infection : a model of molecular pathogenesis ». *N. Engl. J. Med.*, 1985, **312**, 1683-1694.

RIOU J.Y., GUIBOURDENCHE M., YVERT F., « Ecologie des *Neisseria gonorrhoeae* ». *Méd. Mal. Infect.*, 1985, **9 bis**, 481-490.

Treatment Guidelines, Sexually Transmitted Diseases, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. 1989.

Neisseria meningitidis

ASHTON F.E., RYAN A., DIENA B. and JENNINGS H.J., « A new serogroup (L) of *Neisseria meningitidis* ». *J. Clin. Microbiol.* 1983, **Y1**, 722-727.

FRASCH C.E., « Status of a Group B *Neisseria meningitidis* Vaccine ». *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1985, **4**, 533-536.

PELTOLA H., « Meningococcal disease : still with us ». *Rev. Infect. Dis.*, 1983, **5**, 71-91.

A signaler :

- Le numéro spécial de *Médecine et Maladies infectieuses* de 1984, Tome **XIV**, consacré au méningocoque et sa pathologie.
- Le numéro spécial de *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 1986, vol 52, n°3, « International symposium on the emerging epidemic of meningococcal disease in N.W. Europe ».

Autres *Neisseria*

MARTIN P., GUIBOURDENCHE M. et RIOU J.Y., « A propos des *Neisseria* et *Branhamella* trouvées en localisation inhabituelle ». *Ann. Biol. Clin.* 1981, **39**, 273-278.

RIOU J.Y., GUIBOURDENCHE M. and POPOFF M.Y., « A new taxon in the genus *Neisseria*. *Ann. Microbiol.*, (Inst. Pasteur), 1983, **134 B**, 257-267.

Chapitre V

MORAXELLA - BRANHAMELLA

Ce sont des bactéries en forme soit de coccobacilles (*Moraxella*), soit de cocci (*Branhamella*). Les bacilles sont très courts et arrondis, parfois coccoïdes. Ils se présentent habituellement en paires ou en courtes chaînettes, souvent pléiomorphes, ils montrent des variations de taille, de longueur et sont fréquemment sous forme filamenteuse dans les cultures. Les cocci se présentent isolés ou en paire et leur morphologie est identique à celle des *Neisseria*.

Les *Moraxella*, immobiles à l'examen direct à l'état frais (absence de flagelles), sont cependant capables de déplacement par glissement ou par saccades lorsqu'ils sont en contact avec une surface appropriée (chambre à huile de Piéchaud et sur milieu semi-solide : Barker et Maxted). Cette mobilité est liée à la présence de pili.

Ils sont à Gram (-) mais ils se décolorent difficilement. Ils peuvent être capsulés.

Ils sont aérobies stricts, certaines espèces respirent les nitrates en anaérobiose. Ils possèdent une cytochrome C oxydase et en général une catalase.

Ils ne produisent pas de pigment, ne produisent pas d'acide à partir des hydrates de carbone et sont sensibles à la pénicilline.

Ce sont des bactéries chimio-organotrophes avec des exigences nutritives complexes, et dont les facteurs de croissance sont en général inconnus.

La température optimale de croissance se situe entre 33 et 35°C. Ce sont des saprophytes habituels des muqueuses de l'homme et des animaux à sang chaud. Leur pouvoir pathogène est en général limité, sauf sur terrain débilité où ils se comportent comme des pathogènes opportunistes.

MORAXELLA

HISTORIQUE

Morax (1896) et Axenfeld (1897) ont individualisé la conjonctivite due à un diplobacille sérophile dans le groupe mal défini des conjonctivites catarrhales. Ils ont cultivé la bactérie et montré son pouvoir pathogène. A. Lwoff (1939) crée le genre *Moraxella* pour le séparer *iSHAemophilus*.

1 - CLASSIFICATION DES ESPÈCES - NOMENCLATURE

Le regroupement du genre *Moraxella* en deux sous-genres *Moraxella* et *Branhamella* a été effectué sur la base d'études génétiques. L'ancienne dénomination de *Moraxella* oxydase (-) correspond actuellement au genre *Acinetobacter*.

Dans le sous-genre *Moraxella*, trois espèces sont étroitement liées du point de vue génomique *M. lacunata*, *M. bovis*, *M. non liquefaciens*.

M. osloensis, *M. phenyipyruvica*, *M. atlantae* ont plus- de différences génétiques entre elles et diffèrent des autres *Moraxella*. *M. urethralis* s'écarte beaucoup de ces espèces et a été rattachée au genre *Oligella*, un nouveau genre dans la famille des *Neisseriaceae*.

Il est proposé de rassembler *Branhamella* et *Moraxella* en une nouvelle famille, les *Branhamaceae*.

II - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Sur milieu gélose les colonies sont irisées. La culture en bouillon présente un trouble homogène avec un voile en surface où l'on retrouve les mêmes formes courtes que sur gélose.

A l'isolement, le meilleur milieu de culture est constitué par la gélose au sang qui permet de satisfaire les exigences nutritives complexes des *Moraxella*. En dehors de *M. lacunata*, les autres espèces peuvent être cultivées sur gélose nutritive contenant de l'extrait de levure.

La sérophilie de *M. lacunata* s'explique par un besoin en acide oléique. Elle peut être reproduite en eau peptonée où la croissance est proportionnelle à la concentration en tween 80 (ester d'ac. oléique).

Un milieu minéral simple contenant un sel d'ammonium comme source d'azote et de l'acétate comme source de carbone est suffisant pour permettre la croissance de *M. osloensis* et *O. urethralis*, caractère utile pour leur identification. Cependant ce type de milieu ne permet pas leur isolement.

M - MORAXELLA LACUNATA

A - Morphologie

Dans le pus conjonctival : gros bâtonnets droits, trapus à extrémités arrondies, groupées surtout en diplobacilles, parfois isolés ou en courtes chaînettes au milieu de polynucléaires et de cellules épithéliales.

En culture : plus polymorphes, diplobacilles, gros diplocoques. Présence de corpuscules métachromatiques.

B — Caractères cultureux et identification

- sérophile : ne pousse jamais sur milieu ordinaire
- milieu d'isolement : gélose au sang, gélose chocolat
- gélose sérum : en 24 h à 35 à 37°C, petites colonies ayant souvent moins de 1 mm, grisâtres, semi-transparentes, grossissant par la suite avec un centre saillant et une périphérie plus mince.
- sérum coagulé : dès 24 h petites cupules de liquéfaction caractéristiques, (« lacunes ») qui augmentent par la suite. Le sérum est progressivement liquéfié.

- gélatine + sérum à 37°C : liquéfaction
- lait + sérum (aérobiose) culture, parfois coagulation.

C — Pouvoir pathogène naturel

C'est l'agent de la conjonctivite subaigue diplobacillaire décrite par Morax. Contagieuse, non épidémique, non saisonnière, peu fréquente, bénigne, le plus souvent bilatérale ou le devenant secondairement, elle évolue volontiers vers la chronicité.

Elle est caractérisée par un accollement matinal des paupières, une légère sécrétion mucopurulente, une rougeur limitée habituellement au rebord palpébral et à l'angle interne de l'œil (caroncule), rarement compliquée. Une kératite peut être observée (ulcère grave, serpigneux avec hypopion). C'est une complication bactérienne éventuelle du trachome. Elle est guérie rapidement par les collyres au sulfate de zinc ou aux antibiotiques.

L'extrême sensibilité de ce germe aux antiseptiques et aux antibiotiques fait que *M. lacunata* n'est plus que très rarement isolé.

La classification actuelle rassemble *M. lacunata* et *M. liquefaciens* (*M. duplex* var. *liquefaciens*) qui étaient distinguées auparavant sur trois seuls critères (culture plus facile et plus rapide et sérophilie non obligatoire) et pouvoir pathogène plus prononcé pour ce dernier.

IV - MORAXELLA BOVIS (anc. *M. duplex* var. *bovis*)

Cette espèce a été décrite par Hauderoy et coll. en 1937 puis par Bovre en 1979.

A - Caractères bactériologiques

- Protéolytiques : gélatine et sérum coagulé liquéfiés
- Lait : coagulé et peptonisé
- Hémolytique
- Ne réduit pas les nitrates
- Pas d'uréase
- La présence de sérum favorise la culture.

B - Pouvoir pathogène

C'est l'agent de la kérato-conjonctivite infectieuse des bovidés répandue dans le monde entier. Une espèce tout à fait semblable appelée *M. equi* est isolée chez les chevaux.

V - MORAXELLA NON LIQUEFACIENS

(*M. duplex* var. *non liquefaciens*)

Cette espèce a été décrite par Scarlett en 1916 puis par Bovre en 1979.

Les colonies sur gélose au sang ont 2 à 3 mm après 48 heures. Certaines sont très muqueuses et non hémolytiques, ces colonies bombées et coulantes peuvent faire penser à *Klebsiella*.

A - Caractères bactériologiques

- La gélatine et le sérum ne sont pas liquéfiés
- Nitrates réduits en nitrites
- Uréase présente chez quelques rares souches.

B - Habitat

Dans le tractus respiratoire de l'homme, il est habituel dans les fosses nasales, qui est probablement son principal habitat naturel, il est présent dans la gorge et les crachats.

C - Pouvoir pathogène

Il est encore incertain. Il pourrait être un agent de surinfections secondaires et de certains cas de bronchites purulentes. Isolé dans des cas de méningites, de septicémies, les preuves formelles de son rôle pathogène ne sont pas toujours apportées.

VI - MORAXELLA PHENYLPYRUVICA

Cette espèce a été décrite par Bovre et Henriksen en 1967.

Les colonies sur gélose au sang sont assez petites : 0,5 à 1 mm après 24 heures.

La croissance est lente, difficile, la présence de sérum l'améliore.

Le nom de l'espèce vient du fait que l'acide phénylpyruvique est le produit de désamination de la phénylalanine et du tryptophane.

A - Caractères bactériologiques

- Habituellement non hémolytique, mais on peut noter un verdissement de la gélose autour des colonies.
- Nitrates habituellement réduits en nitrites
- Gélatine et sérum coagule non liquifiés
- Uréase habituellement présente
- Très sensible à la pénicilline, des souches résistantes ont été décrites qui possèdent une bêta-lactamase.

B - Habitat

Il est mal connu. Des souches sont isolées des voies génito-urinaires, des urines, du sang, du LCR, de pus, de différentes lésions. Un abcès du cerveau a été décrit.

C - Pouvoir pathogène

Il est sans doute faible, et mal connu à l'heure actuelle.

VII - MORAXELLA OSLOENSIS

Cette espèce a été décrite par Bovre et Henriksen en 1967, et isolée à Oslo pour la première fois. On peut mettre en évidence des inclusions de poly-bêta hydroxybutyrate (PHB) en cultivant les germes sur un milieu approprié contenant une source d'azote en quantité limitante.

Ce germe est souvent capsulé, les colonies sont lisses, souvent opaques. La croissance est assez facile. Il n'a pas d'exigences spéciales et peut être cultivé sur un milieu minéral simple avec de l'acétate comme source de carbone.

A - Caractères bactériologiques

- Non hémolytique
 - Sérum coagulé et gélatine non liquéfiés
 - Réduction des nitrates par la moitié des souches
 - Uréase rarement présente
 - Pas de désamination de la phénylalanine
 - Citrate rarement utilisé
- Moins sensible à la pénicilline que les autres espèces, certaines souches sont résistantes et possèdent une bêta-lactamase.

B - Habitat

Il est mal connu. Cette espèce peut être isolée de l'appareil génito-urinaire, du sang, du LCR, du tractus respiratoire supérieur.

C - Pouvoir pathogène

Il est probablement faible. Quelques souches ont été isolées dans des cas d'infections sévères.

VIII - MORAXELLA ATLANTAE

Cette espèce a été décrite par Bovre et coll. en 1976. Les colonies sont petites s'incrétant parfois dans la gélose. Cette espèce est rarement isolée du sang, du LCR, de la rate. Son habitat et son pouvoir pathogène ne sont pas définis.

IX - OLIGELLA (*Moraxella urethralis*)

Sur la base d'études génétiques *M. urethralis* a été rattachée au **nouveau genre** *Oligella* où l'on distingue deux espèces : *O. urethralis* et *O. ureolytica*.

A - Caractères bactériologiques

- Absence de réduction des nitrates
- Réduction des nitrites
- Peut être cultivé sur milieu minéral simple avec de l'acétate
- Présence d'inclusions de poly-bêta hydroxybutyrate
- Très sensible à la pénicilline

B - Habitat

Cette espèce est isolée du tractus génito-urinaire, de l'urine et de l'appareil génital de la femme.

Son pouvoir pathogène est mal connu, elle peut être isolée chez des sujets immunodéprimés.

PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES
ESPÈCES DES GENRES *MORAXELLA* et *OLIGELLA*

Caractère	<i>MORAXELLA</i>						<i>OLIGELLA</i>	
	<i>lacunata</i>	<i>bovis</i>	<i>non lique- faciens</i>	<i>atlantae</i>	<i>phenyl- pyruvica</i>	<i>osloensis</i>	<i>wethralis</i>	<i>ureoly- rica</i>
Sérophilie	+	±						
Hémolyse		+						
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+f		+f	+	+f	+f	+	+
Liquéfaction sérum coagulé et gélatine	+	+	-	-	-	-	-	-
Uréase (Christensen)	-	-	-	-	+	-	-	+
Nitrate réductase	+	-	+	-	(+)	±	-	
Citrate								+
Phénylalanine désaminase					+			
Croissance en milieu minéral + acétate	-	-	-	-	-	+	+	+
Pénicilline (sensibilité)	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+

f = faible, (+) = la plupart des souches sont positives

BRANHAMELLA

Seule espèce de *Branhamella* isolée chez l'homme, *B. catarrhalis* était appelée auparavant *Neisseria catarrhalis* et a été séparée des autres *Neisseria* en 1970.

Trois autres espèces de *Branhamella* ont été récemment décrites. Elles sont isolées chez l'animal : *B. caviae* (chien), *B. ovis* (mouton), *B. cuniculi* (lapin).

Bien que présentant des caractères communs avec les *Neisseria* : cocci à Gram (-), oxydase (+), catalase (+), les *Branhamella* n'ont aucune parenté génétique avec ce genre.

L'opportunité de leur rattachement aux *Moraxella* dans le sous-genre *Branhamella* est actuellement discuté.

1 - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Le diagnostic de cette espèce sera porté sur les caractères suivants :

- absence d'acidification des hydrates de carbone
- absence de pigment, et de synthèse de polysaccharides
- croissance sur milieux usuels
- hydrolyse de la tributyrine
- production de lipase et de DNase
- réduction des nitrates et des nitrites
- ni hémolyse ni verdissant de la gélose au sang.

Un faible pourcentage des souches est résistant à la colimycine et croît sur le milieu VCF. La résistance de la vancomycine permet la fabrication de milieux sélectifs.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

n est actuellement mieux connu. Le rôle de *B. catarrhalis* a été montré dans :

- les infections broncho-pulmonaires : chez les personnes âgées, avec une insuffisance respiratoire (silicose, emphysème) ou cardiaque gauche ; chez les prématurés, les patients immunodéprimés...
- les infections ORL de l'enfant (otites moyennes, sinusites, rhinopharyngites)
- les septicémies et les méningites (exceptionnelles)
- les infections oculaires et vénériennes (rares).

Ces infections sont courantes en milieu hospitalier.

La présence concomitante de *B. catarrhalis* producteur de B-lactamase et de *Streptococcus pneumoniae* ou d'*Haemophilus influenzae* sensibles à la pénicilline dans les voies respiratoires a permis de développer la notion de pouvoir pathogène indirect : *B. catarrhalis* protégerait les autres agents pathogènes respiratoires de l'action de l'antibiotique permettant la prolongation de l'infection malgré un traitement *a priori* suffisant par ampicilline ou amoxicilline. Dans ce cas un traitement par une céphalosporine orale est justifié.

Pendant, il faut noter que *B. catarrhalis* est souvent le seul agent pathogène isolé au cours d'épisodes infectieux. Pour le moment, il n'a pas été mis en évidence de facteurs de virulence chez cette bactérie.

B. catarrhalis est souvent isolé de l'oro-pharynx de l'enfant mais il est peu fréquent chez l'adulte.

III - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

B. catarrhalis est en règle générale sensible aux antibiotiques. Mais actuellement plus de la moitié des souches possède une B-lactamase hydrolysant les pénicillines. Cette enzyme est constitutive et le gène porté par le chromosome. Inactive sur la cloxacilline et les céphalosporines, elle est inhibée par l'acide clavulanique.

B. catarrhalis est sensible aux macrolides et aux cyclines. Il est résistant au triméthoprime.

BIBLIOGRAPHIE

- CATLIN B.W., « *Branhamella catarrhalis* : an organism gaining respect as a pathogen ». *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, 3, 293-320.
- DENAMUR E., AUBRY P., LAURANS G., SCHMIT J.L., MUIR J.F., EB F., ORFILA J., « Pneumonies alvéolaires à *Branhamella catarrhalis* de l'adulte. Revue de la littérature. A propos de huit cas personnels ». *Méd. Mal. Infect.*, 1987, 12, 701-707.
- HADDAD J., LE FAOU A., SIMEONI U., MESSER J. « *Branhamella catarrhalis* en pathologie infectieuse pulmonaire néonatale ». *Pédiatrie*, 1985, **XXXX**, n° 7, 553-556.
- ROSSAU R., KERSTERS K., FALSEN E., JANTZEN E., SEGERS P., UNION A., NEHLS L., DE LEY J. « *Oligella*, a new genus including *Oligella urethralis* comb. nov. (formerly *Moraxella urethralis*) and *Oligella ureolytica* sp. nov. (formerly CDC group IVe) : relationship to *Taylorella equigenitalis* and related taxa ». *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1987, 37, 198-210.

Le supplément 3, Drugs, 1986, volume 31, est consacré à *B. catarrhalis*.

Chapitre VI

ACINETOBACTER

HISTORIQUE

En 1911 Beijerinck a décrit un germe isolé du sol, *Micrococcus calcoaceticus*.

En 1939 De Bord publie un travail préliminaire sur un groupe de coccobacilles à Gram (-) proches des *Neisseria* qu'il considère comme la tribu des *Mimae* (*Mima polyphorma*).

En 1940 Audureau décrit une espèce qu'elle rapproche des *Moraxella*, sans avoir leurs exigences nutritives, sous le nom de *Moraxella Iwoffi*.

De nombreux auteurs ont essayé d'imposer leur vision du genre c'est ainsi que les synonymes sont :

- Pour les espèces formant de l'acide à partir du glucose :

Herelleavaginicola, De Bord 1942

Bacterium anitratum, Schaub et Hauber 1948

Neisseria winogradskyi, Lemoigne et coll. 1952

Achromobacter anitratum,

Acinetobacter anitratum, Brisou et Prévôt 1954

Moraxella glucidolytica, Piéchaud 1956

B5W

- Pour les espèces ne donnant pas d'acide à partir du glucose :

Alcaligenes haemolysans, Henriksen 1937

Moraxella Iwoffi, Audureau 1940

Mima polymorpha,

Acinetobacter Iwoffi, Brisou et Prévôt 1954

Achromobacter haemolyticus, var. *alcaligenes* 1962

Achromobacter citroalcaligenes.

Baumann, Doudoroff et Stanier en 1968 ont proposé de réunir toutes ces variétés dans une **seule** espèce et un seul genre *Acinetobacter calcoaceticus*.

1 - CLASSIFICATION - NOMENCLATURE

Il s'agit de coccobacilles, courts, souvent en diplocobacilles, immobiles, à Gram négatif. Ce sont des aérobies stricts, souvent encapsulés, ne réduisant pas les nitrates, catalase (+), oxydase (-). Prototrophes, ils peuvent croître sur un milieu minéral avec une source de carbone simple. GC 39 à 47 moles %.

La dernière édition (1984) du Bergey's Manual reconnaît une seule espèce, *Acinetobacter calcoaceticus*, avec 7 phénotypes (Ap A₂, A₃, Bp B₂, B₃, 84).

Toutefois il n'est pas rare de trouver dans certains manuels une distinction entre diverses variétés ou biotypes : *A. calcoacticus* var. *anitratum*, var. *haemolyticus*, var. *alcaligenes*, var. *Iwoffi*. La dernière édition du Manual of Clinical Microbiology préfère retenir deux sous-espèces : *A. calcoaceticus* subsp. *anitratum* et subsp. *Iwoffi* qui correspondent en fait aux réalités de la bactériologie médicale courante.

En 1986, Bouvet et Grimont se basant sur des études d'hybridation ADN-ADN ont décrit 12 géospecies. Ce nombre est aujourd'hui d'une vingtaine. Les caractères phénotypiques des six plus fréquents d'entre eux sont montrés dans le tableau I. *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent isolée en milieu hospitalier.

II - CARACTÈRES GÉNÉRAUX, PHYSIOLOGIQUES ET MÉTABOLIQUES

Les colonies ont 1 à 2 mm de diamètre en 24 heures, elles sont lisses souvent muqueuses, blanc-jaunâtre et d'aspect butyreux.

Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites ou alors très rarement et très lentement.

Certaines souches acidifient sans production de gaz le glucose, galactose, mannose, xylose, arabinose, lactose. Le glucose est oxydé en acide gluconique, les glucides sont oxydés en acides hexoniques et pentoniques par une aldose déshydrogénase non spécifique.

Les *Acinetobacter* capables d'utiliser le glucose comme source de carbone et d'énergie dégradent ce composé uniquement selon la voie d'Entner-Doudoroff.

La possibilité pour certains *Acinetobacter* (*glucidolytica*) de former de l'acide en aérobiose à partir du glucose est liée à la présence chez ces souches d'une glucose-déshydrogénase qui oxyde le D.glucose en D.gluconolactone et la possibilité pour certaines souches de croître aux dépens du glucose, est fonction de leur possibilité de dégrader l'acide gluconique. L'oxygène est l'accepteur terminal d'électrons pour la forme particulière de cette enzyme qui est absente chez les souches non saccharolytiques.

Acinetobacter ressemble aux *Pseudomonas* par le fait qu'il peut utiliser une large variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Il n'exige pas de facteurs de croissance particuliers et peut croître dans un milieu minéral simple avec une seule source de carbone et d'énergie. Les voies métaboliques utilisées par ce germe pour la biosynthèse ou la dégradation des composés aromatiques, des hydrocarbures, du 2-3 butanediol sont semblables à celles des *Pseudomonas* (Joni 1978).

Beaucoup d'*Acinetobacter* sont capables de dégrader des hydrocarbures de C8 à C20, en les utilisant comme sources de carbone et d'énergie : par exemple, le n-hexadécane est transformé en acide hexadécanoïque.

Toutes les enzymes du cycle de Krebs et du cycle du glyoxalate sont présents. Certaines souches utilisent le citrate d'autres pas. *Acinetobacter* contient une chaîne respiratoire fonctionnelle de transporteurs d'électrons (cytochromes a₁ a₂ o d et b, le cytochrome c est absent).

Dans les conditions habituelles de l'identification bactériologique, *Acinetobacter* ne réduit pas les nitrates en nitrites, mais les sels d'ammonium, les nitrates et les nitrites peuvent servir de sources d'azote. Cultivé en présence de sels d'ammonium *Acinetobacter* produit une glutamate déshydrogénase liée au NADP. Cultivé en présence de nitrate ou de nitrite *Acinetobacter* synthétise une nitrate réductase assimilatrice à molybdène de 96 kDa.

Certaines souches *S'Acinetobacter* produisent des exoenzymes : lipase, gélatinase, hémolysine (phospholipase C).

Gutnick et Rosenberg ont proposé en 1977 de leur faire jouer un rôle dans la solution des problèmes de pollution causés par les transpons de pétrole et dans la décomposition des huiles de vidange de moteurs. *Acinetobacter* produit un émulsifiant polyanionique et utilise des composés chlores biphenylés, propriétés qui pourraient être utilisées dans le contrôle des polluants.

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Bactérie ubiquitaire, *Acinetobacter* se trouve principalement dans le sol et l'eau (douée, marine), les eaux d'égouts, isolée parfois dans le lait et les produits laitiers, dans les aliments. Elle est très fréquemment isolée chez l'homme : peau, salive, urine, conjonctive. Elle figure parmi les bactéries de la flore résidente normale du revêtement cutané.

Les sources d'infections nosocomiales à *Acinetobacter* sont nombreuses en milieu hospitalier. Cette bactérie a la faculté de coloniser de nombreux matériels : respirateurs, humidificateurs, lavabos, savons et antiseptiques. Elle peut être véhiculée par les mains du personnel soignant et la majorité des infections sont

acquises à l'hôpital. Le fait que les *Acinetobacter* soient fréquemment isolés de la peau des malades hospitalisés, mais aussi de sujets normaux ne permet pas de dire avec certitude s'il s'agit de germes commensaux ou de contaminants.

Des immunsérums marqués à la fluorescéine dirigés contre les antigènes capsulaires peuvent servir de marqueurs épidémiologiques pour rechercher la source d'une infection nosocomiale. La détermination du lysotype des souches est également utilisée dans des laboratoires très spécialisés.

J.F. Vieu utilise deux systèmes de lysotypie. Le premier schéma comprend 21 bactériophages spécifiques et permet de distinguer actuellement 112 lysotypes, les souches non-typables variant entre 25 à 35 %. Un deuxième schéma complémentaire du premier permet de limiter à 20 % cette proportion et de subdiviser les souches non typables en 20 sous-types et un groupe de souches insensibles. L'utilisation de la lysotypie a permis de montrer qu'il existe en milieu hospitalier des foyers épidémiques dus au même lysotype, la réalité des substitutions de flore par des souches d'*Acinetobacter* de lysotypes différents et le caractère ubiquitaire de certains lysotypes dans divers hôpitaux en France alors que d'autres ont une localisation géographique limitée.

Un système de biotypie a été développé par P.M.J. Bouvet pour *A. bawnannii*.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Les *Acinetobacter* sont parfois considérés uniquement comme des contaminants des prélèvements. Ils sont cependant dans un certain nombre de cas (où il faudra discuter l'origine de l'infection) responsables de méningites graves, de septicémies, de pleurésies, de conjonctivites, de sinusites, de suppurations cutanées, d'infections urinaires, d'ulcérations intestinales, de péricardites.

Lorsque *Acinetobacter* est isolé dans les hémocultures, le foyer initial est souvent un cathéter ou s'est constitué à la suite d'une intervention de chirurgie digestive. On peut observer une bactérienne ou une septicémie vraie, ceci souvent sur un terrain débilisé. Il s'agit de malades fragilisés par une intervention chirurgicale majeure, un traumatisme, le grand âge.

Dans les infections urinaires, une cause mécanique est souvent retrouvée (adénome prostatique, grossesse, sondage).

Les méningites peuvent être secondaires à une manœuvre chirurgicale ou à un traumatisme, ou primitives. Le diagnostic différentiel rigoureux avec les *Neisseria* s'impose. Dans les cas authentiques de méningites à *Acinetobacter*, le pronostic est mauvais.

Les suppurations à *Acinetobacter* peuvent survenir notamment en chirurgie osseuse par surinfections de plaies provenant de la pose de prothèses (hanche), de broches, d'enclouages.

Dans les infections respiratoires *Acinetobacter* peut être isolé lors de pleurésies, de pneumonies, dans les crachats et aspirations de malades de réanimation.

V - PHYSIOPATHOLOGIE

Le pouvoir pathogène naturel à *Acinetobacter* est faible et il faut injecter de fortes doses à l'animal pour observer des manifestations pathologiques ou un effet léthal. C'est avant tout l'effondrement des défenses immunitaires qui favorise la colonisation et les surinfections chez les malades des unités de soins intensifs. Il est vraisemblable que les polysaccharides capsulaires s'opposent à la phagocytose chez les sujets déficients en anticorps opsonisants et en cellules phagocytaires. Comme pour toute bactérie à Gram négatif, l'endotoxine est responsable du choc septique.

VI - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Identification (Tableau I)

L'identification d'*Acinetobacter* est basée tout d'abord sur les caractères morphologiques : diplobacilles à Gram (-), souvent polymorphes avec des formes allongées filamenteuses. Cette morphologie ne doit pas les faire confondre avec *Neisseria*.

La culture est facile sur les milieux usuels. Certaines souches ont une odeur désagréable ; quelques rares souches sont hémolytiques sur gélose au sang. Ils sont tous oxydase négative et immobiles.

Les principaux caractères à étudier sont :

- absence de réduction des nitrates
- acidification du glucose
- croissance en bouillon à différentes températures (44°C, 41°C et 37°C)
- citrate de Simmons
- recherche de B-xylosidase et d'une γ GT
- gélatinase

Le diagnostic différentiel se fait facilement avec *Neisseria*, *Moraxella* et les autres bacilles à Gram négatif aérobies.

Les marqueurs épidémiologiques (sérotypes, lysotypes) d'*Acinetobacter* ne sont pas disponibles au niveau d'un laboratoire courant, il est nécessaire de s'adresser à un Centre de Référence.

TABLEAU I
PRINCIPAUX CARACTÈRES DE DIFFÉRENTIATION DES *ACINETOBACTER*

TEST	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. haemolyticus</i>	<i>A. junii</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. lwoffii</i>
Acidification du Glucose	+	M	-	-	•	
y glutamyltransférase	+	+	-	-	-	
Pxylosidase	-	M	d	-		I-]
Bouillon à 44°C		+				
Bouillon à 41°C		+		[+1		
Bouillon à 37°C	+	+	+	+		+
Lactate (utilisation)	+	+		+	+	+
Citrate Simmons	+	+	[+]	d	+	
Malonate (utilisation)	+	+				
Hémolyse		-	+		-	
Gélatinase	-		[+1	-		

d = caractère variable ; [+1] et [-] = exceptions à ces caractères.

B - Structure antigénique

Acinetobacter, germe ubiquitaire, est complexe du point de vue de sa structure antigénique de surface. Plusieurs séries de travaux ont mis en évidence des groupes sérologiques différents. Marcus en 1969 en utilisant des anticorps marqués à la fluorescéine montre l'existence de 28 sérovars chez les souches saccharolytiques, mais également d'autres sérovars chez les souches ne produisant pas d'acide par oxydation du glucose. Adam à l'aide d'immunsérums préparés avec des bactéries chauffées ou formolées distingue 41 facteurs K par agglutination sur lame et 40 groupes O par hémagglutination indirecte. Certaines parentés antigéniques ont été décrites entre le polysaccharide capsulaire de certaines souches d'*Acinetobacter* et les streptocoques B,

G, le pneumocoque type 23. De même des réactions croisées s'observent entre des anticorps *anti-Chlamydia* et un antigène soluble non dialysable et thermostable d'*Acinetobacter*.

C - Immunité

Le sujet sain résiste parfaitement à la colonisation et à l'infection par cette bactérie. Seuls les malades immunodéprimés sont fréquemment colonisés et occasionnellement infectés. Il est probable qu'il existe des mécanismes naturels de défense contre *Acinetobacter* mais les parts respectives de l'immunité naturelle et de l'immunité acquise sont inconnues. On sait que l'hétéro-polysaccharide capsulaire et le lipo-polysaccharide sont antigéniques. Il est possible que la résistance naturelle à l'infection soit en partie liée à l'existence de réactions croisées entre les antigènes capsulaires d'*Acinetobacter* et ceux des streptocoques B et G et de *S. pneumoniae* type 23.

VII - TRAITEMENT

Le traitement des surinfections dues à *Acinetobacter* est souvent difficile en raison de la multirésistance de ce germe. Au cours des années, l'évolution vers la résistance à plusieurs antibiotiques s'est faite régulièrement. Celle-ci est sous la dépendance de facteurs chromosomiques (production de bêta-lactamases donnant une résistance d'emblée élevée aux bêta-lactamines) et de facteurs plasmidiques codant pour la résistance épidémique aux aminosides.

En 1983, une bêta-lactamase de type TEM 1 ($\pi = 5,4$) a été mise en évidence chez *A. calcoaceticus* ; elle est inhibée par l'acide clavulanique et le sulbactam. Ceci peut indiquer une voie thérapeutique et la nécessité de rechercher l'activité des associations avec ces inhibiteurs de bêta-lactamases. En 1982, une souche d'*Acinetobacter* multirésistante responsable d'une épidémie dans un service de soins intensifs produisait une céphalosporinase et une pénicillinase de type TEM 2 et était résistante à de nombreux aminosides selon un phénotype de résistance plasmidique fréquemment observé dans cet hôpital chez les bactéries à Gram négatif. La transmission de la résistance aux aminosides, au chloramphénicol et aux sulfamides était liée à un transposon de 16 Md provenant d'un plasmide conjugatif R de la flore hospitalière. Les phénotypes de résistance aux aminosides, très divers, s'expliquent par l'existence d'enzymes modifiant les aminosides en particulier 3'-phosphotransférase (APH 3'), 3 N-acétyltransférase du type 1 (AAC3), 6'N-acétyltransférase (AAC6'), 3"adényltransférase (AAD3"). En 1983 un plasmide autotransférable, d'origine exogène, pour la résistance au chloramphénicol, aux aminosides, à l'ampicilline, aux sulfamides et au triméthoprimé a été caractérisé.

Les *Acinetobacter* sont très résistants à la majorité des antibiotiques. Les nouvelles bêta-lactamines n'apportent pas dans l'ensemble un gain substantiel d'activité. Les CMI 50 de la meziocilline, aziocilline, cefopérazone, ceftriaxone sont élevées et seules la ticarcilline et la pipéracilline se distinguent parmi les molécules commercialisées avec environ 60 et 20 % de souches sensibles. Parmi les nouveaux antibiotiques on constate une activité notable de la ceftazidime et surtout de l'imipénème qui est parfois le seul antibiotique actif.

L'activité des aminosides reste très variable sur les souches hospitalières à *Acinetobacter*. La gentamicine accusait alors une baisse d'activité en raison de l'augmentation de son utilisation. Les chiffres publiés des CMI 50 ne reflètent pas la situation actuelle où l'on constate un nombre important de souches résistantes à l'un ou plusieurs aminosides : gentamicine, tobramycine, nétilmicine, amikacine. L'amikacine et la tobramycine sont, en général, les plus actives.

Les nouvelles quinolones amènent certainement pour cette espèce une possibilité thérapeutique nouvelle. L'acide nalidixique avait une certaine activité mais

l'apparition de quinolones de deuxième génération (péfloxacine, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacine) augmente le nombre de souches atteintes avec des valeurs de CMI relativement basses. L'utilisation de certaines de ces quinolones par voie générale constitue un progrès dans le traitement des infections à *Acinetobacter*.

L'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et la rifampicine peuvent être parfois efficaces. *Acinetobacter* est sensible aux polymyxines.

BIBLIOGRAPHIE

BAUMANN P., DOUDOROFF M., STANCER R.Y., « A study of the Moraxella group », J. Bacteriol., 1968, 95, 58-73 et 1520-1541.

BERGOGNE-BEREZIN E., JOLY-GUILLOU M.L., VIEU J.F., « Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus* », J. Hosp. Infect., 1987, 10, 105-113.

BOUVET P.J.M., GRIMONT P.A.D., « Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter Iwoffii* ». Intem. J. Syst. Bacteriol., 1986, 36, 228-240.

DENIS F., BEAREZ M.C., « Importance en pathologie humaine et sensibilité aux antibiotiques des *Acinetobacter* (*Moraxella oxydase*-) ». Méd. Mal. Infect., 1972, 2, 349-371.

JONI E., « Genetics and physiology of *Acinetobacter* », Ann. Rev. Microbiol., 1978, 32, 349-371.

MONTEIL H., RASOAMANANJARA D., « Autres bacilles à Gram négatif et antibiotiques », in l'Antibiogramme (P. Courvalin et coll. éd.) 1985, MPC-VIDEOM, pp. 127-132.

GILARDI G.L., « Identification of miscellaneous glucose non-fermenting Gram-negative bacteria », in G. L. GILARDI (éd.) : Glucose Non-fermenting Gram-negative Bacteria, in Clinical Microbiology CRC Press, West Palm Beach, 1978.

JOLY-GUILLOU M.L., BERGOGNE-BEREZIN E., VIEU J.F., « Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des *Acinetobacter* en milieu hospitalier ». Presse Méd., 1990, 19, 357-361.

SANTOS FERREIRA M.O., VIEU J.F., KLEIN B., Phage-types and susceptibility to 26 antibiotics of nosocomial strains of *Acinetobacter* isolated in Portugal, J. Int. Méd. Res., 1984, 12, 364-368.

TOWNER K.J., BERGOGNE-BEREZIN E., FEWSON C.A., « The biology of *Acinetobacter*, Taxonomy, Clinical importance, Molecular relevance », Plénum Press, New York, 1991.

ANNEXE

KINGELLA

Ce genre a été décrit par Henriksen et Bovre en 1976. Se présentant en paires ou en courtes chaînettes, ce bacille à Gram négatif a tendance à résister à la décoloration. Immobile, selon les critères habituels, il peut posséder des *fimbriae* et montrer une mobilité par saccades. Bactérie aérobie ou anaérobie facultative, oxydase (+) catalase (-), elle pousse (mieux en aérobie qu'en anaérobie) sur gélose au sang où la croissance est faible. GC % = 47 à 55.

Deux types de colonies sont habituellement distinguées sur gélose au sang :

- les unes s'étalent, creusent la surface de la gélose (le diagnostic différentiel avec *Eikenella corrodens* peut se poser), possèdent des *fimbriae* et la mobilité saccadée.
- les autres sont lisses et convexes sans autres propriétés.

Trois espèces sont décrites : *Kingella kingae*, *K. denitrificans*, *K. indologenes*. Ces espèces saprophytes des muqueuses et du tractus respiratoire supérieur sont peu fréquemment isolées, mais sans doute méconnues la plupart du temps.

K. kingae peut être isolée dans des crachats et lors de surinfections osseuses, de septicémies et d'endocardites. C'est une espèce très sensible aux bêta-lactamines, aux aminosides, aux macrolides et aux tétracyclines.

K. denitrificans pose essentiellement un problème de diagnostic différentiel avec *N. gonorrhoeae* (il cultive sur milieu sélectif). Le plus souvent isolé du tractus respiratoire supérieur, il peut également se trouver dans des prélèvements rectaux ou génitaux, dans des hémocultures. C'est également une espèce très sensible aux antibiotiques.

SECTION ffl — BACILLES A GRAM POSITIF AÉROBIES

Chapitre VU CORYNEBACTERIUM

GÉNÉRALITÉS SUR LES CORYNEBACTÉRIES

La diphtérie est devenue exceptionnelle dans les pays riches, mais elle persiste dans les pays pauvres. Malgré sa rareté en France et en raison de la gravité, il est indispensable que les laboratoires de bactériologie soient capables d'identifier *Corynebacterium diphtheriae*. Avec les progrès de la bactériologie, on reconnaît d'autres corynébactéries qui peuvent être pathogènes-opportunistes lors des hospitalisations au long cours, notamment chez des sujets immunodéprimés.

1 - CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE

La plupart des taxonomistes s'accordent pour restreindre le genre *Corynebacterium* aux seuls organismes :

- dont la paroi contient
 - de l'acide méso-diaminopimélique
 - de l'arabinose, du galactose
 - des chaînes d'acides mycoliques relativement **courtes** (22 à 38 atomes de carbone)
 - un GC % de 51 à 59 ;
- qui sont pour la plupart anaérobies facultatifs.

Il existe des relations entre les corynébactéries (humaines et animales), les mycobactéries et les *Nocardia* (ac. méso-diaminopimélique, arabinose, galactose, ac. mycoliques).

Les limites du genre *Corynebacterium* sont assez floues, avec certains représentants du groupe des « corynéformes », notamment *Brevibacterium* (ac. mésodiaminopimélique (+), GC % 60-64), *Arthrobacter*, *Microbacterium*...).

Il a été proposé récemment de sortir du genre *Corynebacterium* les espèces *C. haemolyticum*, *C. equi*, *C. pyogenes* ; *C. haemolyticum* devenant *Arcanobacterium haemolyticum*, *C. equi* : *Rhodococcus equi* et *C. pyogenes* : *Actinomyces pyogenes*. De même, on a proposé de classer un certain nombre de corynéformes dans le genre *Oerskovia*.

II - HABITAT ET RÉPARTITION

C. diphtheriae est une bactérie strictement humaine qui colonise essentiellement le rhinopharynx, plus rarement la peau. Il existe des porteurs sains. *C. xerosis* et *C. pseudodiphtheriticum* sont des hôtes normaux de l'homme.

D'autres espèces peuvent être pathogènes à la fois pour l'homme et les animaux. *C. ulcérons* et *C. bovis* sont retrouvés chez les vaches (mastites), *C. pseudotuberculosis* chez le mouton et le cheval, *C. pyogenes* chez le chat, le mouton et le porc, *C. equi* chez le cheval, le porc et le chat. D'autres corynébactéries ou corynéformes peuvent être trouvées dans les eaux (*C. aquaticum*), le sol ou les plantes.

CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE

HISTORIQUE

- En 1821, Bretonneau a individualisé la diphtérie et en a signalé l'aspect contagieux.
- En 1883, Klebs décrit le bacille dans les fausses membranes d'angines diphtériques et en 1884, Loeffler isole la bactérie, puis montre son pouvoir pathogène expérimental pour le cobaye.
- En 1888, Roux et Yersin montrent qu'une toxine thermolabile est sécrétée dans le milieu de culture par *C. diphtheriae* et que cette toxine, inoculée à l'animal, reproduit les manifestations générales de la diphtérie.
- En 1890, Behring et Kitasato immunisent des animaux avec de la toxine modifiée et montrent le pouvoir neutralisant du sérum de ces animaux vis-à-vis de la toxine diphtérique.
- En 1923, Gaston Ramon prépare un vaccin avec une toxine modifiée par la chaleur et le formol, l'anatoxine diphtérique.

I - PHYSIOPATHOLOGIE

C. diphtheriae se multiplie préférentiellement dans les couches superficielles de certains épithéliums : rhinopharynx, plus rarement larynx ou peau ; on peut aussi le retrouver au niveau des conjonctives.

La multiplication s'accompagne d'adénopathies satellites, mais n'entraîne pas de bactériémie.

Les enzymes et la toxine produites, provoquent localement une réaction inflammatoire avec formation d'un exsudât épais : la fausse membrane. La toxine diffusant à distance du siège de la multiplication bactérienne, par voie sanguine, va atteindre différents tissus, bloquer la synthèse des protéines dans les cellules cibles, et être responsable de complications (cardiaques, nerveuses,...).

II - POUVOIR PATHOGENE

A - Expérimental

Un certain nombre d'animaux sont sensibles à *C. diphtheriae*, ou plutôt à sa **toxine**. C'est le cas du singe, du cheval et du lapin, mais le cobaye est l'animal de **choix**.

L'inoculation sous-cutanée de 1 ml de culture pure de *C. diphtheriae* à un cobaye, provoque l'apparition rapide d'un œdème local, gélatineux, fibrino-hémorragique, riche en bacilles, suivi d'une adénopathie et de la mort de l'animal en 2 à 4 jours. A l'autopsie, on constate l'absence de germes dans le sang et les organes, et une surrénalite hémorragique due à la toxine. L'injection intra-dermique de toxine

produit un effet nécrotique. La toxine possède également un effet cytotoxique observé *in vitro* sur cellules humaines ou animales.

B - Naturel

La transmission de *C. diphtheriae* d'homme à homme est :

- le plus souvent directe par l'intermédiaire de gouttelettes salivaires (de malades ou de porteurs sains), ou par contact avec des plaies contaminées,
- plus rarement indirecte par l'intermédiaire d'objets, de poussières ou d'aliments souillés. Il s'agit d'un germe résistant plusieurs mois sur les objets ou dans les fausses membranes desséchées.

Dans la diphtérie, on reconnaît l'intrication de deux types de manifestations :

- locales : liées à la multiplication du germe au niveau de la porte d'entrée,
- générales : liées à la toxinogénèse responsable des formes malignes.

1. Diphtéries « communes »

Le rôle de la toxine reste ici au second plan à condition toutefois qu'un diagnostic rapide permette l'instauration d'une sérothérapie précoce, sans délai.

Localisation pharyngée : c'est l'angine diphtérique commune ou angine à fausses membranes (amas fibrineux infiltrés de polynucléaires et de bacilles diphtériques).

Après une incubation silencieuse de 2 à 5 jours, survient une période d'invasion insidieuse marquée par un malaise général, une température (38°C) et une dysphagie qui précèdent la période d'état caractérisé par :

- une angine à fausses membranes : enduits blancs, grisâtres, en fausses membranes adhérentes, cohérentes, se reproduisant *in situ* en quelques heures après ablation (extensives). Ces fausses membranes peuvent envahir les amygdales, mais aussi les piliers du voile, et engainer la lnette « en doigt de gant » ; mais l'angine n'est pas toujours aussi typique (érythémateuse, pultacée, pseudo-gangreneuse).
- un coryza discret et des adénopathies cervicales modérées, accompagnent cette angine à fausses membranes.
- les signes fonctionnels (dysphagie) et généraux restent à l'arrière plan (pâleur, tachycardie, fièvre modérée).

Dans cette forme, si la sérothérapie est instituée rapidement, l'évolution sera bénigne. Toutefois en l'absence de traitement et parfois d'emblée, on se trouve devant les diphtéries graves voire malignes.

D'autres localisations se rencontrent :

- la forme laryngée ou « croup » est soit primitive, soit associée à la forme pharyngée ; elle comprend classiquement trois phases : la phase dysphonique (modification de la toux et de la voix), la phase dyspnéique et la phase asphyxique.
- plus rares sont les autres localisations (nasales, conjonctivales, œsophagiennes, cutanées, vaginales).

2. Diphtéries « malignes »

Elles sont caractérisées par l'importance :

- des signes locaux (fausses membranes confluentes, muqueuse hémorragique, baleine fétide)
- des signes régionaux (jetage séro-sanglant, adénopathies cervicales donnant un aspect du cou proconsulaire)
- des signes généraux.

La mort peut survenir en quelques heures ou, après une amélioration passagère, plus tardivement dans le cadre du syndrome secondaire de Marfan (avec signes cardiovasculaires, rénaux, digestifs)

Les complications dues à la toxine peuvent survenir plus ou moins tardivement dans l'évolution de la diphtérie. Il s'agit :

- de myocardite qui succède à une diphtérie grave ou maligne, parfois à une forme commune tardivement traitée ;
- des paralysies favorisées par l'âge (adulte), par la gravité de la diphtérie initiale, et l'absence ou le retard de la sérothérapie. On observe dans l'ordre chronologique : la paralysie du voile du palais (2^e semaine), la paralysie de l'accommodation, la paralysie des membres, d'autres paralysies peuvent être observées (nerfs crâniens...).

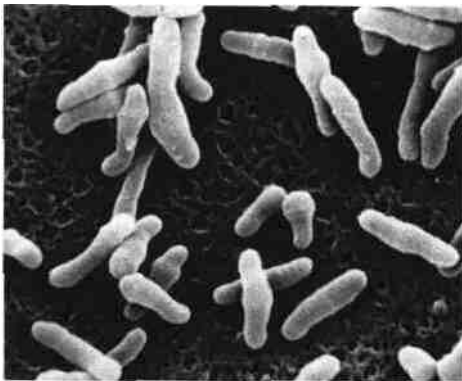
La gravité de l'infection est en rapport avec le retard mis pour instaurer le traitement, mais aussi avec l'existence de souches plus toxigènes que d'autres (souches *gravis*) et des infections associées (streptocoques)...

3. Diphtéries cutanées

Jusqu'à ces toutes dernières années, les diphtéries cutanées pures avec formation de pseudomembranes nécrotiques au niveau de la lésion avaient surtout été signalées en zone tropicale, or ces formes ne sont pas l'exclusivité de pays en voie de développement ; des pays tels que l'Allemagne, la Hollande, la Suède pour l'Europe et aussi le Canada et les USA en ont rapportées (en 1975, aux USA 56 % de toutes les souches de *C. diphtheriae* avaient été isolées à partir de prélèvements cutanés) ; il faut penser à ces formes en France en sachant que parfois *C. diphtheriae* est associé à *S. aureus* ou *S. pyogenes*.

III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Caractères morphologiques



C. diphtheriae se présente sous forme de bacilles de 1-8 µm / 0,3-0,8 µm, droits ou légèrement incurvés, avec des extrémités arrondies ou renflées (aspects en haltères ou en massues).

Les souches plus toxigènes dites « *gravis* » contiennent des bacilles plus courts que les autres (*intermedius* et *mitis*).

Ces bacilles sont à Gram positif mais ils sont facilement décolorés par l'alcool.

On peut colorer spécifiquement les granules métachromatiques (coloration d'Albert, d'Emst-Neisser, de Del Vecchio) ou corps de Babes-Emst, contenus dans les extrémités renflées des bacilles ; ces granules sont des réserves de polyphosphates ou grains de volutine.

Ces bacilles sont caractérisés par leur groupement, qu'on les observe dans les fausses membranes (aspects en lettres ou petits amas) ou en culture (gros amas en paquets d'épingles, en palissades, caractères chinois, en chiffres romains ou lettres majuscules : L, M, N, V, ...).

Ce mode de groupement s'explique par une séparation incomplète au moment de la division bactérienne car il existe un point d'attache entre les bacilles. Des formes d'involution granuleuses ou ramifiées peuvent être observées dans les cultures vieilles.

Structure de *C. diphtheriae*

On distingue :

a) une paroi formée de 4 couches visibles en microscopie électronique : couche externe irrégulière, couche centrale non homogène faite de 2 couches denses séparées par une couche de faible densité aux électrons.

Le peptidoglycane de type 1 contient de l'acide méso-diaminopimélique, avec pont interpeptidique D-alanyl-acide-diaminopimélique.

On trouve aussi dans les parois :

- un polysaccharide ou arabinogalactane (antigène 0 de Lautrop), donnant des réactions croisées avec les *Mycobacterium* et les *Nocardia*.
- des acides gras, acides corynémycoliques et corynémycoliniques
- un glycolipide toxique ou « Cord Factor »

b) en surface, on trouve des antigènes K de nature protéique, qui jouent **un rôle dans l'immunité** et l'hypersensibilité, et qui sont utilisés pour la classification sérologique.

c) un cytoplasme contenant :

- des lipides associés aux nombreux mésosomes
- des granulations métachromatiques, ou grains de volutine
- des organelles inhabituels dans les souches toxigènes.

B - Caractères cultureux

C. diphtheriae est une espèce aérobie-anaérobie facultative, possédant une catalase, des cytochromes a, b, c, mais pas d'oxydase.

La culture est obtenue à une température optimale de 36-37°C et un pH optimal à 7,4.

La culture peut être obtenue sur milieux ordinaires, mais la croissance :

- sur milieu enrichi est meilleure (gélose au sang, milieu de Mueller-Hinton, sérum coagulé de boeuf ou de cheval, milieu de Loeffler ou au sérum de boeuf coagulé), où l'on observe des colonies de 1-3 mm, lisses, grisâtres, crémeuses en 16 à 24 heures
- sur gélose au sang révèle une hémolyse bêta qui permet une première orientation
- sur milieux sélectifs, peut être nécessaire. On utilise classiquement des milieux contenant du tellurite de potassium, sur lesquels *C. diphtheriae* donne des colonies noires en réduisant le tellurite en tellure ; mais la culture sur gélose au sang à l'acide nalidixique donne de bons résultats.

Les colonies sont visibles en 16 heures sur milieux enrichis et en 48 heures sur certains milieux sélectifs.

Elles prennent un aspect différent sur gélose au sang contenant du tellurite, selon le type de souches :

- *gravis*, grosses colonies « R » crénelées (à mamelon central)
- *intermedius*, petites colonies lisses ou rugueuses
- *mitis*, grosses colonies « S » bombées et brillantes.

Si pour la culture les souches sont assez peu exigeantes (facteurs de départ : acide oléique, source de carbone et d'énergie, facteurs de croissance variables avec les souches), elles le sont pour la toxinogénèse où la cystine et l'acide glutamique sont essentiels. D'autres acides aminés interviennent ainsi qu'une faible acidification (maltose), une agitation et surtout la concentration en fer (taux optimal 0,14 u.g/ml). Il existe une corrélation entre le fer, la porphyrine et la production de toxine (on dispose, pour obtenir une bonne toxinogénèse, de milieux empiriques, semi-synthétique ou synthétiques).

Si le bacille résiste bien à l'abri de l'air, il est détruit par la chaleur, la lumière, les antiseptiques et les antibiotiques. De plus, il est concerné par le phénomène d'antibiose, son développement étant inhibé par diverses espèces bactériennes (staphylocoques par exemple).

C - Caractères biochimiques

Pour porter un diagnostic de *C. diphtheriae*, il importe de différencier cette espèce des autres bactéries « corynéomorphes », fréquentes au niveau du rhinopharynx de l'individu normal.

La seule possession d'une catalase et d'une nitrate réductase ne suffit pas pour écarter toutes ces autres espèces (Tableau I).

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES PRINCIPALES ESPÈCES DE CORYNEBACTERIES

<i>Corynebacterium</i>	Catalase	Hémolyse p	Nitrate réductase	Uréase	Attaque des sucres	
					Glucose	Saccharose
<i>C. diphtheriae</i>	+	V	+		+	
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	(+)	V	+	+	
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (<i>hofmannii</i>)	+		+	+		
<i>C. ulcérons</i>	+	+faible		+	+	V
<i>C. xerosis</i>	+		+		+	+
<i>C. jeikeium</i>	+				+	
<i>A. haemolyticum</i>		+	-		+	V
<i>A. pyogenes</i>	+			+	V	

L'étude du métabolisme glucidique est important ; on peut utiliser des milieux spéciaux, milieux liquides enrichis au sérum (tel le milieu de HISS) ; il y a fermentation sans production de gaz du glucose, de la dextrine, du galactose, du maltose. Il n'y a pas d'attaque du saccharose, du lactose du mannitol.

L'étude du métabolisme protéique donne des renseignements complémentaires : uréase (-) (recherché sur milieu de Lange), indole (-), gélatinase (-) et H₂S (+).

On signale des hémolysines non diffusibles, une neuraminidase.

D - Bactériophages

Il existe un grand nombre de souches lysogènes ou porteuses de phages défectifs. Un système de lysotypie a été développé avec 22 lysotypes. Des études ont porté sur des bactériocines ou corynécines, et une bactériocinotypie a été proposée.

E - Caractères antigéniques

La structure antigénique de *C. diphtheriae* est hétérogène. On distingue des antigènes O thermostables polysaccharidiques (de groupe) et des antigènes K thermolabiles protéiques (de type).

Les études antigéniques sont discordantes selon les auteurs, et n'ont pas débouché sur une nomenclature internationale.

IV - TOXINE DIPHTÉRIQUE

La toxine diphtérique est l'une des toxines bactériennes qui a été le plus étudiée. Sa structure et les mécanismes cellulaires et moléculaires de son action figurent parmi les plus connus.

La production de toxine par *C. diphtheriae* est liée à l'état de lysogénie des souches qui hébergent le phage bêta porteur du gène *Tox*. Ce bactériophage à ADN bicaténaire s'intègre sous forme de prophage dans le chromosome bactérien. Les souches non lysogènes (*Tox*-) ne produisent pas de toxine mais peuvent être virulentes. Infectées par un bactériophage *Tox*+ elles synthétisent et excrètent la toxine.

La toxinogénèse est fonction de **la teneur en fer du milieu de culture**, elle est optimale lorsque cette concentration est basse. Il existe un répresseur codé par le génome bactérien qui ne serait actif qu'associé au fer agissant comme corépresseur. Ce répresseur a été partiellement purifié, c'est une protéine contenant du fer qui, en présence de ce métal, se lie à l'ADN.

La toxine diphtérique est une exotoxine, protéine d'environ 58 kDa dont le gène a été clone dans *E. coll*. La séquence nucléotidique a été déterminée et traduite ; ainsi la séquence des 535 acides aminés est connue. Sous l'action de la trypsine, la toxine est hydrolysée en deux fragments A et B, ces deux polypeptides restent unis par un pont disulfure. Le fragment A (d'environ 21 kDa) NH₂ terminal possède l'activité enzymatique. Le fragment B (d'environ 37 kDa) COOH terminal se fixe sur le récepteur cellulaire. Le premier fragment contient la séquence signal intervenant dans la sécrétion de la toxine par la bactérie. La chaîne B possède une région riche en acides aminés hydrophobes responsables de l'insertion de la toxine dans la membrane de l'endosome et par conséquent du passage de la chaîne A de l'endosome vers le cytoplasme. Le 148^e acide aminé est probablement le siège du site actif.

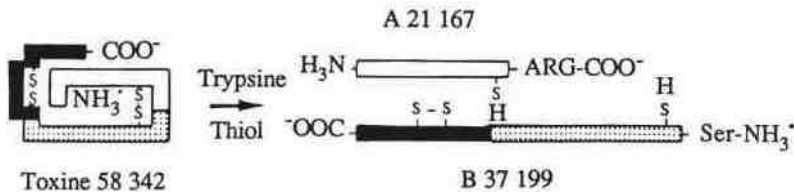
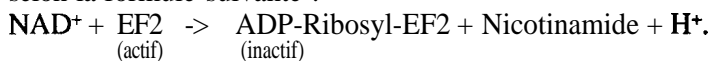


SCHÉMA 1

ACTIVATION DE LA TOXINE DIPHTÉRIQUE PAR LA TRYPSINE EN PRÉSENCE DE THIOLE

La région en noir, à COOH-terminal, est chargée positivement et reconnaît les récepteurs à la surface des cellules sensibles. La région en blanc, fragment A, à NH₂-terminal, est la partie active de la molécule et est masquée si la toxine est intacte. La région en pointillés est la partie hydrophobe de la molécule.

La toxine diphtérique agit comme une enzyme. Elle inactive le facteur d'élongation EF2 composant essentiel dans la synthèse protéique qui permet la translocation du polypeptidyl-t RNA du site accepteur A au site donneur P du ribosome de la cellule eucaryote. La toxine catalyse le transfert sur EF2 de l'ADP ribose du NAD selon la formule suivante :



Les anticorps dirigés contre le fragment A inhibent l'action de la toxine (ADP ribosylation) dans un système de traduction *in vitro*. Au contraire, les anticorps dirigés contre le fragment B, inhibent l'action sur les cellules mais pas sur les ribosomes.

La toxine diphtérique est donc une molécule spécialisée très active dont l'action enzymatique est portée par le fragment A. Une seule molécule est létale pour la cellule. Elle altère la synthèse des protéines en quelques heures.

En 1989, Chang a montré que la toxine diphtérique provoquait des lésions de l'ADN liées à une activité nucléasique et entraînait une cytolysse qui n'est pas la simple conséquence d'une inhibition de la synthèse protéique.

Titration de la toxine diphtérique

H peut être réalisé *in vivo* et *in vitro*.

In vivo :

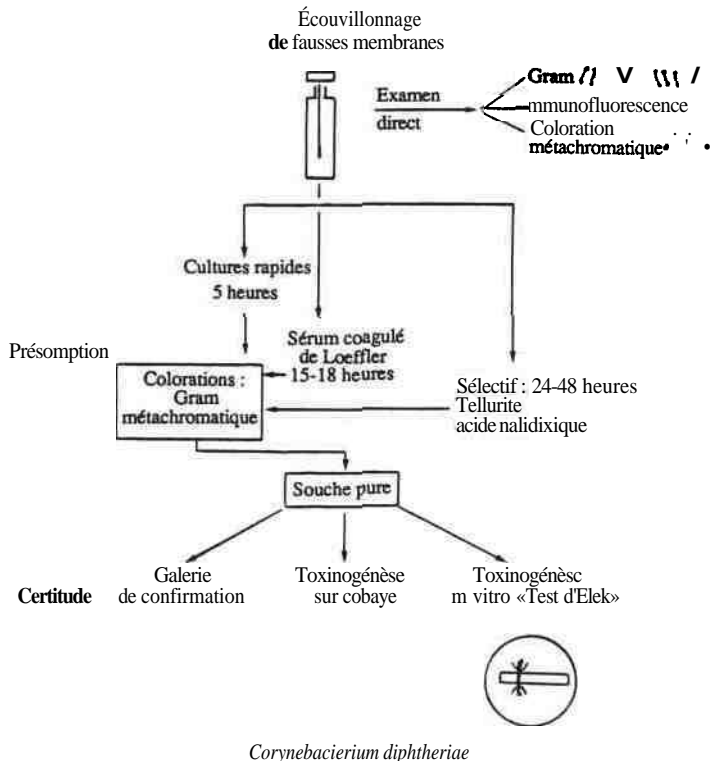
- détermination du pouvoir létal (dose minimale mortelle, DMM ; dose létale 50 %, DL 50)
- neutralisation du pouvoir létal (L+, LO)
- neutralisation du pouvoir dermo-nécrotique chez le cobaye
- titrage en cultures cellulaires

In vitro :

- floculation initiale (techniques de Ramon, de Dean et Webb ; détermination de la dose floculante LF)
- précipitation en milieu gélose.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Le diagnostic bactériologique de la diphtérie repose sur l'isolement de *C. diphtheriae*, c'est le diagnostic direct (schéma 2).



Corynebacterium diphtheriae

SCHÉMA 2
MÉTHODES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION
DE *CORYNEBACTERIUM DIPHThERIAE* A PARTIR D'UNE GORGE

A - Prélèvements

Le prélèvement de gorge pour la recherche de *C. diphtheriae*, doit être pratiqué devant toute angine à fausses membranes, mais de même que les angines diphtériques sont parfois atypiques, les angines à fausses membranes peuvent avoir d'autres causes qu'il importe de rechercher parallèlement et systématiquement (association fuso-spirillaire, angine à pyogènes, candidoses, mononucléose infectieuse, hémopathies malignes...).

Le prélèvement doit être effectué sous contrôle visuel et avant tout traitement :

- les fausses membranes prélevées à l'écouvillon ou à la pince au niveau **du** pharynx (ou du larynx lors de la trachéotomie)
- écouvillonnage à la périphérie de la fausse membrane (amygdale, voile, luette)
- plus rarement écouvillonnage nasal, de sérosités cutanées ou conjonctivales, **en** fonction du tableau clinique.

Le prélèvement doit être acheminé au laboratoire sans délai, avant dessèchement ; il doit comporter au moins deux écouvillons (examen direct et culture).

B - Examen direct

On procédera sur les frottis

- à une coloration de Gram classique, éventuellement de Gram avec décoloration prolongée, à la recherche de bacilles à la morphologie évocatrice.
- à une coloration d'Ernst-Neisser pour la recherche de corpuscules métachromatiques.
- l'examen en immunofluorescence est signalé par certains auteurs.

Pressé par le clinicien, qui demande un diagnostic rapide, le microbiologiste pourra tout au plus indiquer à ce stade : « présence » ou « absence » de bacilles diphtérimorphes à l'examen direct, en sachant que la vision de tels bacilles correspondra plus souvent sous nos latitudes à *C. pseudodiphtheriticum* ou *C. xerosis* qu'à des *C. diphtheriae*. Le clinicien ne doit pas attendre un résultat bactériologique, s'il y a suspicion clinique il commencera sans retard le traitement spécifique, sans attendre les résultats de la culture.

C - Culture

C'est une étape importante. On a décrit des techniques rapides donnant un diagnostic présomptif en 4 et 5 heures, écouvillon plongé dans du sérum coagulé, dans du sang tellure... (techniques de Folger, de Manzullon, de Sohier). Elles ne sauraient remplacer les techniques classiques avec cultures sur deux types de milieux.

Les cultures sur milieux riches (milieu de Loeffler ou à défaut Mueller-Hinton ou gélose au sang) donnent une culture en 12 à 18 heures.

Les cultures sur milieux sélectifs, surtout les milieux au sang tellure (Clauberg, Hoyie) ou agar-cystine-tellurite sur lesquels *C. diphtheriae* donne des colonies noires, (mais aussi quelques diphtérimorphes ou streptocoques) et à défaut, gélose au sang à l'acide nalidixique ou acide nalidixique/colistine. La résistance de *C. diphtheriae*. et des autres corynébactéries à la fosfomycine peut être utile, les géloses au sang pouvant être rendues sélectives par ajout d'un disque de fosfomycine (200 u.g).

Après une incubation de 18 à 48 heures on observe les colonies, procède à un Gram, éventuellement à une coloration métachromatique et à une recherche de catalase (si les milieux ne contiennent pas de sang). Sur les colonies suspectes, on réalise une galerie d'identification (nitrate-réductase, attaque des sucres, hydrolyse de l'urée) pour différencier *C. diphtheriae* des autres corynébactéries (Tableau I). Une galerie récemment commercialisée (API-Coryne) utilise 20 caractères.

Il est essentiel d'ensemencer en même temps un bouillon (milieu riche du type cœur-cerveille) qui permettra ensuite de réaliser le pouvoir pathogène expérimental. Une sérotypie, une lysotypie, ou une bactériocinotypie peuvent être réalisées sur les souches de *C. diphtheriae* dans des laboratoires spécialisés.

Récemment, Rappuoli a pu, par une technique d'hybridation, obtenir une classification génomique des souches, permettant une analyse épidémiologique très fine et peut-être une dissociation de la toxinogénèse et des facteurs de virulence.

D - Recherche du pouvoir toxigène

Il est indispensable de prouver que la souche de *Corynebacterium* isolée est un *C. diphtheriae* producteur de toxine.

Cette recherche peut être réalisée **selon deux** méthodes :

in vivo :

- soit par la mise en évidence du **pouvoir létal** par inoculation au cobaye (inoculation par voie sous-cutanée d'un bouillon de culture à un cobaye de 300 g environ non protégé et à un autre cobaye ayant reçu 250 unités de sérum antidiphthérique 2 heures avant l'injection ; l'animal non protégé meurt en 2 à 4 jours). Il est nécessaire de faire l'autopsie de l'animal (oedèmes viscéraux, hémorragies des surrénales).
- soit par recherche du **pouvoir dermo-nécrotique** après injection intradermique sur les flancs rasés d'un cobaye.

in vitro :

- réaction **d'immunoprécipitation** en gel (Test d'Elek). On ensemence parallèlement sur la surface du milieu gélose la souche à étudier entre 2 souches de référence (*Tox+* et *Tox-*), puis on dépose perpendiculairement une bande de papier filtre imbibée de sérum antitoxine diphthérique (schéma 3). On observe l'apparition d'arcs de précipitation, qui, s'ils sont spécifiques, doivent rejoindre les arcs observés avec la souche *Tox+*. Le délai de lecture est de 1 à 6 jours.

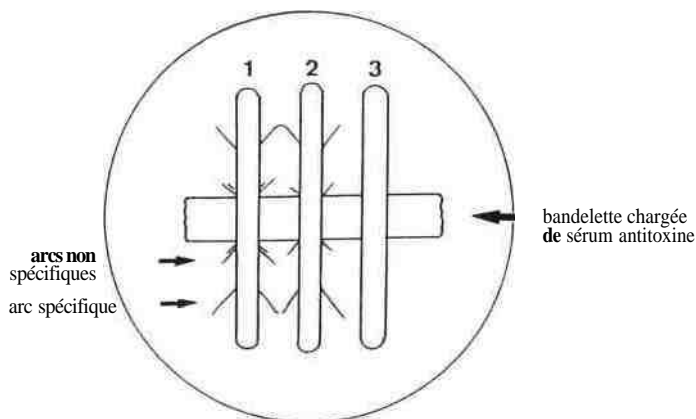


SCHÉMA 3

TEST D'ELEK AVEC SOUCHE 1 DE RÉFÉRENCE TOXIGÈNE
souches 2 et 3 à étudier, la 2 est toxigène, la 3 ne l'est pas.

E - Diagnostic indirect

Il n'existe pas de sérodiagnostic permettant de porter a posteriori un diagnostic de diphtérie.

Par contre, on peut mesurer l'immunité antitoxique et non antimicrobienne. Elle peut être :

passive : transplacentaire (nourrissons de moins de 6 mois) obtenue par sérothérapie (transitoire),

active : du fait d'une infection naturelle, typique ou occulte, **ou** bien obtenue grâce à la vaccination.

L'immunité peut être testée par :

le dosage des antitoxines sériques,

la réaction de Schick : une injection intradermique de 0,1 ml de toxine diphtérique produit une réaction inflammatoire locale (plus de 1 cm en moins de 36 heures) chez les sujets n'ayant pas d'antitoxines ; l'injection de 0,1 ml de toxine par voie intradermique chez un sujet immunisé n'entraîne pas de réaction.

VI - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques ont peu d'effet sur l'évolution de la maladie, mais le traitement de l'entourage et des porteurs permet de limiter la diffusion du germe. La réalisation d'un antibiogramme est importante car des résistances aux antibiotiques ont été signalées récemment.

On utilise pour l'antibiogramme, ou pour la détermination des CMI, le milieu de Mueller-Hinton, additionné de 5 % de sang de mouton. Pour certaines souches *intermedius* ou *mitis*, on a recours au milieu trypticase-soja, enrichi avec 10 % de sérum de veau foetal.

C. diphtheriae est sensible à la pénicilline, à l'érythromycine et à la majorité des antibiotiques actifs sur les germes à Gram positif ; cependant, des souches résistantes à l'érythromycine, à la clindamycine, aux tétracyclines ont été rencontrées.

Ainsi, 86 % des souches indonésiennes et 5 % des souches africaines résistent aux tétracyclines. Un support plasmidique de la résistance de *C. diphtheriae* à l'érythromycine a été décrit.

VII - TRAITEMENT - PROPHYLAXIE

Tout sujet suspect de diphtérie doit être hospitalisé d'urgence.

A - Traitement curatif

Il repose sur trois éléments essentiels :

- sérothérapie : elle reste le traitement indispensable, elle doit être aussi précoce que possible, dès que le diagnostic est soupçonné sans attendre le résultat bactériologique. C'est une thérapeutique d'urgence. Elle doit comporter une injection unique, maximale d'emblée (IM ou SC) de 2 000 à 5 000 unités par kg avec un maximum de 120 000 unités.
- antibiothérapie : systématiquement associée, par la pénicilline G ou l'érythromycine (50 mg/kg/j durant 15 jours) selon la situation des résistances locales.
- repos strict au lit pendant plusieurs semaines.

En fonction des tableaux cliniques, on aura recours à des traitements spécifiques : **croup** (trachéotomie, corticothérapie), traitements symptomatiques (réhydratation,...), traitement de myocardite, des paralysies...

B - Traitement préventif

Il repose essentiellement sur la vaccination par l'anatoxine qui est de la toxine détoxifiée par le formol à 4 % et par la chaleur (39 à 45°C pendant 1 mois).

La vaccination est obligatoire en France. Elle comporte 3 injections successives à 1 mois d'intervalle, suivies d'un rappel à 1 an, puis tous les 5 ans.

Le vaccin existe également en association DT, DT coq, DT coq polio.

Les réactions vaccinales sont minimes.

Il existe des contre-indications temporaires (eczéma, pyodermites, affections aiguës, réactions tuberculiniques récentes) ou permanentes (affections chroniques graves, tuberculose, néoplasies). En fait la seule vraie contre-indication est la néphropathie grave.

On trouve au bout de 5 ans 70 % de sujets protégés et 50 % après 10 ans.

Récemment un vaccin anti-diphtérique synthétique a été obtenu. Il est constitué de :

- un fragment peptidique situé à la jonction des deux fragments A et B de la toxine diphtérique, il s'agit d'une boucle de 16 acides aminés (PM 1 600) synthétisée *in vitro* constituant l'antigène,
- une molécule porteuse « carrier » faite d'une chaîne peptidique synthétique poly-D-alanine-poly-L-lysine,
- un adjuvant synthétique ou muramyl-dipeptide.

Les essais sur l'animal montrent un pouvoir immunogène.

D'autres mesures collectives sont à respecter en cas de diphtérie :

- la déclaration de la diphtérie est obligatoire (n° 6)
- cette maladie nécessite : l'isolement du malade, la désinfection en cours et en fin de maladie, le dépistage et un traitement des porteurs de germes dans l'entourage, une éviction scolaire pour le malade durant 30 jours après la guérison clinique et pour l'entourage de 7 jours s'il n'est pas correctement vacciné.

Malgré ces mesures le bacille diphtérique et la diphtérie n'ont pas complètement disparu. Une enquête récente sur le portage effectuée en Grèce a montré que 0,8 % des enfants étaient porteurs. Entre 1979 et 1983, 363 cas de diphtérie ont été enregistrés en Europe, soit 0,2 cas par année et par million d'habitants.

Chaque année, le nombre de diphtéries identifiées dépasse 100 cas pour la Turquie et 1000 cas pour l'URSS. En France, la diphtérie a presque disparu (figure 1), on a toutefois recensé 12 cas entre 1984 et 1987. En Suède, où la couverture vaccinale était supérieure à 95 % une épidémie est survenue. Aux USA, on considère que seulement 50 % des adultes sont correctement vaccinés. Ces faits doivent inciter à la vigilance tant sur le plan de la vaccination (rappel chez les adultes) que du diagnostic.

LES AUTRES CORYNÉBACTÉRIES

L'incidence d'infections opportunistes dues à des bactéries corynéformes est croissante alors que les diphtéries diminuent.

Certaines espèces sont ainsi rencontrées chez des sujets immunodéprimés. Il s'agit de : *C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum* (*C. hofmannii*), *C. equi* (*Rhodococcus equi*), *C. matruchotii* (*Bacterionema matruchotii*) ainsi que des groupes définis par le CDC d'Atlanta comme D2, A4, G2...

D'autres espèces sont isolées au cours d'infections chez des sujets non immunodéprimés. Ce sont : *C. ulcérons*, *C. haemolyticum* (*Arcanobacterium haemolyticum*), *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*) et *C. minutissimum*.

Il n'est pas question de passer en revue ici la pathologie induite par ces différentes espèces, seuls quelques points seront développés.

C. ulcérons. : il peut être responsable de pharyngites exsudatives et de tableaux pseudo-diphthériques. Les souches peuvent produire deux toxines dont l'une est neutralisée par l'antitoxine diphthérique, la seconde serait une phospholipase D.

C. pseudotuberculosis (*C. ovis*) : cette espèce a été signalée dans des lymphadénites granulomateuses et dans une pneumonie.

C. xerosis : on a signalé ce germe dans des endocardites sur valve, dans des bactériémies et des pneumonies chez des sujets immunodéprimés.

C. pseudodiphtheriticum (*C. hofmannii*) : cette espèce a pu être à l'origine d'infections sur prothèses et d'une infection fatale chez un transplanté rénal.

C. jeikeium (ex groupe JK) : a été trouvée dans diverses infections septicémiques, péritonéales, génito-urinaires, méningées et endocardites.

Elle est présente à l'état normal sur la peau et peut coloniser jusqu'à 25 à 35 % des patients hospitalisés. Après coloration, cette espèce apparaît sous forme de bacilles à Gram positif parfois très courts évoquant des streptocoques. L'antibiogramme révèle des résistances multiples, certaines souches ne sont sensibles qu'à la vancomycine.

C. minutissimum : peut être isolé de la peau dans les cas d'érythrasma.

C. pyogenes (*Actinomyces pyogenes*) - *C. haemolyticum* (*Arcanobacterium haemolyticum*)

C. haemolyticum a été décrit dans des exsudats membraneux pseudo-diphthériques, mais également dans des septicémies et des abcès divers.

Il apparaît vraisemblable que ce groupe de bactéries est appelé à avoir une place croissante en pathologie. Elles sont sélectionnées par les antibiothérapies, favorisées par les instrumentations (cathéters) et par les terrains immunodéprimés. Il importe donc de savoir les reconnaître au même titre que *C. diphtheriae* qui garde une place à part sur le plan historique et sur le plan de la gravité.

BIBLIOGRAPHIE

BEH, 1987, n° 52, 207.

BROOKS R., « Guidelines for the laboratory diagnosis of diphtheria », *Monographie Organisation Mondiale de la Santé*, 1981, 7, 27 p.

CHANG M.P., BALDWIN R.L., BRUCE C., WIENIESKI B.J., « Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity », *Science*, 1989, **246**, 1165-1168.

COLLIER R.J., « Diphtheria toxin : mode of action and structure », *Bact. Reviews*, 1975, **39**, 54-85.

COYLE M.B. and LIPSKY B.A., « Coryneform bacteria in infectious diseases : clinical and laboratory aspects », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, 3, 227-246.

DENIS F., PRINCE-DAVID M., M'BOUP S., DIOPMAR I., « Antibiotic resistance of *Corynebacterium diphtheriae* in West Africa », *J. Infect.*, 1983, 7, 279-281.

FRENEY J., DUPERRON M.T., COURTIER C., HANSEN W., ALLARD F., BOEUFGRAS J.M., MONGET D., FLEURETTE J., « Evaluation of API Coryne in Comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria », *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 38-41.

KWANTES W., « Diphtheriae in Europe », *J. Hyg. Camb.*, 1984, **93**, 433-437.

LIPSKY B.A., GOLDBERGER A.C., TOMPKINS L.S., PLORDE J.L., « Infections caused by non diphtheria *Corynebacteria* », *Rev. Infect. Dis.*, 1982, 4, 1220-1235.

PAPPENHEIMER A.M., « The diphtheria bacillus and its toxin : a model system », *J. Hyg. Camb.*, 1984, **93**, 397-404.

RAPPUOLI R., PERUGINI M., FALSEN E., « Molecular epidemiology of the 1984-1986 outbreak of diphtheria in Sweden », *New Engl. J. Med.*, 1988, **318**, 12-14.

THOMPSON J.S., GATES-DAVIS D.R., YONG D.C.T., « Rapid microbiological identification of *Corynebacterium diphtheriae* and other medically important corynebacteria », *J. Clin. Microbiol.*, 1983, **18**, 926-929.

Chapitre VIII

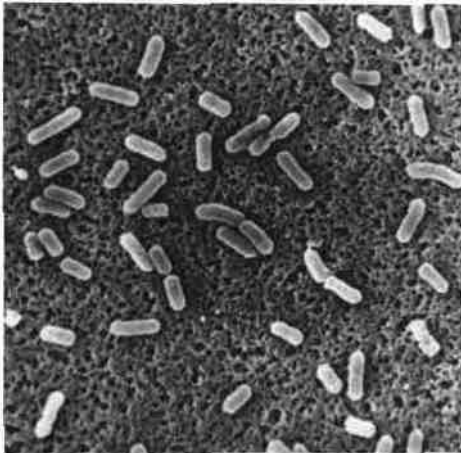
LISTERIA

HISTORIQUE

Listeria monocytogenes, espèce-type du genre *Listeria* (du nom du chirurgien anglais Lord Lister) a été décrite en 1926 par Murray ; la bactérie a été isolée lors d'une épizootie atteignant des lapins et des cobayes qui présentaient une forte augmentation des monocytes circulants et des lésions de nécrose hépatique. Cette bactérie a été isolée ensuite chez différentes espèces animales domestiques et sauvages.

Chez l'homme, elle a été initialement isolée lors d'une méningite chez un adulte ainsi que dans différentes circonstances pathologiques jusqu'à ce que en 1933 Burn montre son rôle dans l'infection en période néo-natale. Les travaux de Seeliger ont par la suite souligné la place importante de *L. monocytogenes* en pathologie humaine.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU GENRE



Le genre *Listeria* regroupe de petits bacilles à Gram positif de forme régulière, courts, à bouts arrondis parfois incurvés (0,4-0,5 x 0,5-2 p.m) isolés ou en courtes chaînes présentant un arrangement en palissade et en lettres comme les corynébactéries, avec parfois des formes filamenteuses (6 - 20 μm) dans les vieilles cultures. Ils sont non sporulés, non capsulés et mobiles à 20-25°C par des flagelles péritriches.

Ce sont des bactéries aéro- anaérobies facultatives. La température optimale de culture est comprise entre 30 et 37°C, mais la culture est possible de 1 à 45°C.

Sur gélose au sang elles donnent des colonies hémolytiques lisses, translucides, gris-bleu, (espèces pathogènes).

Elles ont les caractères suivants : catalase positive, oxydase négative ; glucose fermenté avec production d'acide lactique ; esculine et hippurate hydrolysées, réactions rouge de méthyle et Voges-Proskauer positives ; pas de production d'indole, ni de SH₂, pas d'hydrolyse de l'urée. Il existe des types antigéniques définis par des antigènes O et des antigènes H.

II - POSITION TAXONOMIQUE ET NOMENCLATURE

La position taxonomique du genre *Listeria* n'est pas définitivement établie. Il s'agit d'un genre distinct sans relation avec les Corynébactéries, mais à rapprocher avec les données de la taxonomie numérique, de la sérologie, de la biochimie et l'étude des acides nucléiques des genres *Bacillus*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, 1986). Des études taxonomiques récentes, biochimiques et par hybridation DNA-DNA ont permis de préciser la place des différentes espèces dans le genre qui s'est enrichi de nouvelles espèces.

Le genre *Listeria* comprend des espèces pathogènes pour l'homme ou l'animal et des espèces non pathogènes. *L. monocytogenes* est la seule espèce pathogène à la fois pour l'homme et l'animal.

Les autres espèces sont : *L. ivanovii* (ex sérovar 5 de *L. monocytogenes*, pathogène pour l'animal, mais rarement rencontrée chez l'homme) ; *L. innocua* (non pathogène) ; *L. welshimeri* (non pathogène) ; *L. seeligeri* (non pathogène).

Deux espèces *L. grayi* (isolée chez le chinchilla) et *L. murrayi* (présente dans le sol) de classification incertaine, ont été proposées pour former le genre « *Murraya* » avec deux espèces « *M. grayi* subsp. *grayi* » et « *M. grayi* subsp. *murrayi* ».

L'espèce *L. denitrificans* est exclue du genre *Listeria* pour être transférée dans le groupe *Jonesia*.

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES ESPÈCES DU GENRE *USTERIA*
ET DE *L. GRAYI* ET *L. MURRAYI*

	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>L.</i> <i>ivanovii</i>	<i>L.</i> <i>innocua</i>	<i>L.</i> <i>welshimeri</i>	<i>L.</i> <i>seeligeri</i>	<i>L.</i> <i>grayi</i> *	<i>h.</i> <i>murrayi</i> *
Hémolyse	+	++			+(faible)	-	
CAMP-test							
<i>S. aureus</i>	+				+	-	
<i>R. equi</i>		+					
Acidification							
D xylose		+		+	+		d
Lrhamnose	+		d	d		+	+
mannitol							
a méthyl D mannoside	+		+	+			
Nitrates réductase		-		-			+
Pathogène pour souris	+	+	-	-		-	
Pouvoir pathogène naturel	Animaux		Ovins	-		-	
	homme						
Sérovars	<i>m</i> & <i>ij2h</i> <i>l2c,3a,3b</i> <i>3c,4a,4b,</i> <i>4ab,4c,4d</i> <i>4e,7</i>		5	6a,6b, 4ab, s.nd.	6a,6b	<i>l2b,4c</i> <i>4d,6b</i> s.nd.	

s.n.d. = sérovar non désigné

CAMP = pour Christie, Atkins, Munch-Petersen
(d'après J. ROCOURT, H. SEELIGER)

* *Murrayi*

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

L. monocytogenes est une bactérie saprophyte et ubiquitaire. Largement répandue dans la nature, elle a été isolée dans le sol, l'eau, les végétaux (ensilage) mais aussi dans le lait, la viande de poulet, les légumes (choux) et dans les matières fécales de sujets sains (homme et nombreuses espèces animales). La bactérie survit dans l'environnement naturel, résiste à des conditions hostiles et peut s'y multiplier même à basse température (propriété utilisée comme méthode d'enrichissement).

L'infection par *L. monocytogenes* ou listériose, maladie commune à l'homme et à l'animal, est une **saprozoonose**. La contamination humaine est le plus souvent réalisée par voie digestive et plus rarement par voie oculaire, respiratoire ou cutanée.

La contamination est rarement directe au contact avec des animaux infectés et concerne alors les sujets exposés (éleveurs, vétérinaires) ; des cas de contamination interhumaine en milieu hospitalier (maternités) ont été décrits parfois sous forme de petites épidémies.

La contamination indirecte est le mode de contamination le plus fréquent. L'homme entre en contact avec la bactérie présente dans le milieu extérieur (sol, eau, excréctions animales) ou dans les aliments d'origine animale contaminés (lait, viande, volailles, charcuterie, fromages...) ou d'origine végétale (crudités, choux,...).

Les cas de listériose humaine surviennent généralement sous forme de cas sporadiques avec des variations saisonnières. Lors de contamination par ingestion de produits alimentaires contaminés, de véritables épidémies ont été observées.

Ce fût le cas en Anjou (156 cas entre 1975 et 1978), en Nouvelle Ecosse - due à une salade de choux - (41 cas), à Boston (49 cas) consécutifs à l'ingestion de lait pasteurisé ; des fromages à pâte molle ont été responsables de l'épidémie de Los Angeles en 1985 (142 cas) ou de celle de Suisse en 1987 (122 cas). A noter que *L. monocytogenes* a été isolée de 4 % des échantillons de lait cru et de fromages, de 30 % de prélèvements de produits camés, de 26 % de produits de la mer ou encore de 5 % de salades et légumes préemballés. Les numérations peuvent atteindre 100 à 1000 UFC/g de viande et même 100 000 à 10 000 000 UFC/g pour les fromages !

La maladie humaine peut être observée à tous les âges de la vie avec cependant une répartition des cas selon les tranches d'âge qui fait apparaître trois pics : un premier pic est observé avant l'âge de 1 an et correspond à la listériose néo-natale ; un pic entre 20 et 40 ans, ce qui correspond essentiellement aux cas maternels d'infection materno-foetale ; enfin un troisième pic entre 60 et 80 ans, soulignant ainsi le rôle du terrain.

Chez l'animal la maladie est plus fréquente pendant les saisons froides (hiver, début du printemps). Chez l'homme les cas sembleraient plus fréquents en automne et au printemps.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

L. monocytogenes est une bactérie pathogène pour l'homme et de nombreuses espèces animales.

A - Chez l'animal domestique

Cette bactérie est responsable de différentes manifestations cliniques survenant en hiver et au printemps : avortement et mortinatalité chez les bovins et les ovins ; septicémies de l'agneau avant le sevrage ; encéphalites chez différentes espèces de ruminants ; conjonctivites et kératites purulentes ; mammites. Certaines de ces localisations favorisent la contamination humaine.

B - Chez l'homme

Le nombre de cas de listérioses observés a considérablement augmenté depuis les années 1960. S'agit-il d'une meilleure connaissance de cette espèce bactérienne ou

d'une modification des conditions écologiques ayant favorisé sa dissémination et augmenté les contacts avec l'homme ?

En France, l'incidence serait de l'ordre de 11 à 15 cas par million d'habitants.

1. La listériose foeto-maternelle

La listériose néo-natale peut exister sous deux grandes formes cliniques :

- une infection précoce se manifestant dès les premiers jours de la vie (premières heures, 5 premiers jours). Cette forme correspond à une infection généralisée septicémique survenue avant la naissance.

L'infection chez un enfant de faible poids ou né prématurément se manifeste par un état grave avec des formes septicémiques généralisées, avec ou sans atteintes méningées, les infections locales pulmonaires ou conjonctivales étant plus rares.

La forme majeure est associée à des foyers infectieux granulomateux multiples (d'où l'appellation : *Granulomatosis infantiseptica*). La mortalité est importante.

- la forme tardive est une forme méningée comparable à celle de l'adulte dont le pronostic est moins sombre.

Chez la femme enceinte la maladie a pu être discrète ou bénigne, fièvre isolée syndrome pseudo-grippal ou passée inaperçue. Lorsqu'elle survient en début de grossesse elle entraîne un avortement ; une infection plus tardive provoque un accouchement prématuré.

2. La listériose de l'adulte

Les formes de l'adulte concernent le plus souvent, mais pas de façon exclusive, les sujets ayant une déficience des défenses immunitaires, en particulier de l'immunité cellulaire, lors d'hémopathies malignes, de cancers, ou au cours de traitements immunosuppresseurs, chez les diabétiques et les cirrhotiques, ainsi qu'au cours de la grossesse. *L. monocytogenes* dans ces cas peut être considérée comme une bactérie opportuniste.

Il s'agit le plus souvent de formes neuro-méningées : méningites, méningo-encéphalites, ou encéphalites. L'aspect du liquide céphalorachidien est très variable et peut être trompeur : aspect trouble avec une formule panachée avec une cytologie en général modérée (entre 100 et 500 éléments par mm³), mais aussi liquide clair évoquant une méningite virale ou une méningite tuberculeuse justifiant la mise en culture de tout LCR et la pratique systématique d'hémocultures. Les formes septicémiques sont moins fréquentes accompagnées ou non de localisations métastatiques. Il existe aussi de rares formes localisées : oculaires, cutanées, osseuses, pulmonaires ... surtout rencontrées chez les sujets immunodéprimés ou, pour les formes cutanées sans atteintes systémiques, chez les personnes en contact avec des animaux infectés.

La mortalité des listérioses en France est de l'ordre de 30 %, il en a été de même dans les épidémies observées récemment dans le monde.

V - PHYSIOPATHOLOGIE - FACTEURS DE VIRULENCE

L. monocytogenes est une bactérie à **multiplication intracellulaire** et sa virulence est liée à sa possibilité de multiplication dans les macrophages. La bactérie produit une hémolysine, toxine protéique extra-cellulaire ayant une parenté antigénique avec la streptolysine 0. L'hémolysine se lie au cholestérol et est responsable *in vitro* d'une activité cytotoxique sur diverses cellules eucaryotes en culture et *in vivo* de lésions du système réticulo-endothélial et de l'effet léthal sur les animaux de laboratoire. Le rôle de l'hémolysine dans la virulence de *L. monocytogenes* était suspecté en raison de l'absence de virulence des souches non hémolytiques.

Des études récentes ont montré que l'hémolysine ou listériolysine est un facteur de virulence majeur intervenant dans la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes*. La production d'hémolysine dans les vacuoles après phagocytose provoque la destruction des membranes cytoplasmiques, des lysosomes, de la membrane des vacuoles entraînant la libération de fer dont la présence stimule la croissance bactérienne. D'autres produits pourraient jouer un rôle dans la virulence tels la phospholipase C et l'activité superoxyde-dismutase. L'intemaline est une protéine exprimée en surface de la bactérie qui favorise sa phagocytose.

A ce jour, seules deux espèces : *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont naturellement (*L. ivanovii* pour les animaux) et expérimentalement pathogènes.

VI - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produits pathologiques

La nature du prélèvement est variable selon l'atteinte clinique et l'âge du malade. Chez le nouveau-né la bactérie peut être recherchée dans le liquide gastrique, le méconium, le LCR, le sang, les prélèvements périphériques ; chez la mère les prélèvements concernent le placenta, les lochies, le liquide amniotique. L'hémoculture est aussi indiquée lors de toute infection inexplicée chez la femme enceinte. Dans les autres cas, la recherche est réalisée au niveau du sang, du LCR, des lésions cutanées. La recherche dans les matières fécales permet de déceler les porteurs.

La mise en culture immédiate est souhaitable, mais si cela est nécessaire la conservation est possible à la température ambiante ou à +4°C en raison de la résistance de la bactérie. L'incubation à 4°C peut être utilisée pour enrichir le milieu en *Listeria* (selles, enquêtes épidémiologiques).

Des tentatives de diagnostic rapide par recherche d'antigènes solubles ont été menées par contre-immunoelectrophorèse ou ELISA ; les résultats sont encore décevants : en ELISA pour le type 4b, si la spécificité est de 100 %, la sensibilité est insuffisante car l'antigène est détecté dans seulement un quart des cas.

B - Examen direct

L. monocytogenes est un petit bacille à Gram positif de 0,5 x 1-4 µm. Dans les produits pathologiques, *L. monocytogenes* est habituellement sous forme de bacille court et il existe des formes coccobacillaires en courtes chaînes. Dans le liquide céphalorachidien où les bactéries sont habituellement peu abondantes *L. monocytogenes* est intra ou extra-cellulaire. Des risques de confusion sont possibles à l'examen direct mais doivent être évités (les erreurs les plus fréquentes sont : *Corynebacterium*, les streptocoques, voire *Haemophilus* si la décoloration a été trop importante).

Après culture en milieu liquide les bacilles peuvent être plus longs et disposés en palissade.

C - Caractères cultureux

L. monocytogenes pousse sur les milieux usuels ; la croissance est favorisée par la présence de glucose (0,1 %), de sérum (1 %) ou de sang (5 %). Le pH optimum est de 7 - 7,4. La croissance est obtenue en aérobiose ou en microaérophilie. La température optimale de culture est comprise entre 30 et 37°C, les températures limites de croissance sont de 1°C et 45°C. A + 4°C, *L. monocytogenes* a la propriété

de se multiplier plus rapidement que de nombreuses espèces et cette propriété est utilisée comme méthode d'enrichissement pour des produits contaminés ou pluri-microbiens (méthode de Gray). La culture est possible sur milieux hostiles (hypersalé, bilié, au tellurite de potassium), sur gélose Mac Conkey, mais pas en présence d'azide de sodium.

Sur gélose nutritive (gélose tryptose), après 18 heures à 37°C, les colonies sont petites, arrondies, translucides, gris bleuté. Elles présentent une **iridescence bleu-vert** caractéristique lors d'un examen en lumière oblique (permettant de repérer les colonies lors de culture de produits polymicrobiens).

Sur gélose au sang (mouton, cheval, lapin), les colonies ont le même aspect et sont entourées d'une étroite **zone d'hémolyse** parfois ne dépassant qu'à peine le bord de la colonie et rendue visible en déplaçant la colonie. Le CAMP-test, utilisé pour les streptocoques du groupe B, permet d'étudier les souches de *Listeria* ayant une hémolyse faible ou douteuse ; l'accentuation de l'hémolyse de *S. aureus* est observée pour *L. monocytogenes* et *L. seeligeri* et celle de *Rhodococcus equi* pour *L. ivanovii* (voir Tableau I). *L. ivanovii* produit habituellement une large zone ou de multiples zones d'hémolyse. Les souches non hémolytiques sont considérées comme non pathogènes.

Des milieux sélectifs ont été proposés pour la culture à partir de l'environnement ou de produits pluri-microbiens ; ils contiennent des antibiotiques comme la colistine ou l'acide nalidixique (40 mg/l).

Les différentes espèces de *Listeria* sont des bactéries **mobiles**. La mobilité est bien exprimée à 25°C, mais très faible ou nulle à 37°C. Elle est recherchée en milieu liquide (culbutes et rotations à l'examen microscopique) ou en milieu gélose (ombrelle à distance de la surface) après culture à 25°C.

D - Caractères d'identification et pouvoir pathogène expérimental

Les principaux caractères d'identification de *L. monocytogenes* sont la morphologie de la bactérie et l'aspect des colonies ; la mobilité à 25°C ; catalase positive ; **l'hydrolyse de l'esculine** (réaction rapidement positive, obtenue en quelques heures donc important pour un diagnostic rapide de suspicion) ; l'acidification du glucose et de la salicine, du rhamnose ; absence d'acidification du mannitol, du xylose et de l'arabinose (tableau I).

L'analyse d'électrophorétique enzymatique a montré que les épidémies étaient bien dues au même clone. Par ailleurs, une sonde correspondant au fragment d'ADN codant pour le gène de l'hémolysine p est apparu comme strictement spécifique de *L. monocytogenes* (Datta).

L. monocytogenes et *L. ivanovii* sont pathogènes pour la souris par voie intrapéritonéale.

Le test d'Anton permet d'identifier les souches pathogènes de *L. monocytogenes*. L'introduction dans le sac conjonctival de l'œil de lapin ou de cobaye de 2-3 gouttes d'une suspension de bactéries (préparée à partir d'une culture de 18 heures, 3 gouttes dans 5 ml d'eau distillée) provoque une conjonctivite purulente en 2 à 5 jours guérie par l'administration locale d'ampicilline.

E - Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel des différentes espèces de *Listeria* est présenté dans le tableau I.

Les principaux caractères permettant de différencier *Listeria* d'espèces voisines sont présentés dans le tableau II. Ces caractères concernent des bactéries à Gram positif (morphologie exclue). Il convient de tenir compte dans un diagnostic

différentiel des circonstances d'isolement. Les confusions les plus fréquentes sont celles avec un streptocoque, une corynébactérie, éventuellement *Haemophilus*.

TABLEAU n
PRINCIPAUX CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DE BACTÉRIES À GRAM POSITIF
(morphologie exclue)

	<i>Listeria monocytogenes</i>	Coryné- bactéries <i>faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Bacillus agalacae</i>	<i>Streptococcus</i>
Mobilité	+(25°C)	-	-	-	-	±	-
Granulations métachromadques	-	±	-	-	-	-	-
Spores	-	-	-	-	-	+	-
Catalase	+	+	-	-	-	+	-
Hémolyse	+	d	±	-	-	+	+
Nitrate réductase	-	+(-)	-	-	-	+	-
Mannitol	-	-	+	-ou+	-	±	-
Esculine	+	-	-	+	-	-	-
Urease	-	-ou+	-	-	-	-ou+	-
SH ₂	-	-	-	-	+	-	-
Test Anton	+	-	-	-	-	-	-

F - Classification : sérotypes, lysotypes

Il existe des Ag 0 et des Ag H qui permettent de définir des sérovars. Un même sérovar peut être retrouvé dans deux espèces différentes (voir tableau 1 et diagnostic bactériologique).

Les antigènes somatiques (15 Ag 0 : 1 à XV) et flagellaires (5 Ag H : A à E) permettent de définir 16 types sérologiques ou sérovars (Paterson, Seeliger, Donker-Voet) dans le genre *Listeria*. Ces sérovars présentés dans le tableau III, sont : sérovar 1/2 (a, b et c) ; sérovar 3 (a, b et c) ; sérovar 4 (a, ab, b, c, d, e, f et g) ; sérovars 5, 6 et 7. A l'exception des souches du sérovar 5 qui appartiennent à l'espèce *L. ivanovii*, il n'y a pas de corrélation étroite entre l'espèce et le sérovar. Les espèces *L. grayi* et *L. murrayi* sont apparentées entre elles mais n'ont pas de parenté avec les autres espèces du genre *Listeria*, aussi a-t-on proposé de les classer dans un genre nouveau : *Murraya*.

Les sérovars 1/2a, 1/2b et surtout 4b (65 à 70 % des souches) sont le plus souvent rencontrés en France chez l'homme. Ces mêmes sérovars sont retrouvés chez l'animal ainsi que les autres sérovars plus rares.

En pratique, le typage, complément de l'isolement et de l'identification est réalisé par agglutination sur lame à l'aide d'anti-sérums spécifiques.

La lysotypie de *L. monocytogenes* est possible grâce à des lots de phages qui permettent de typer 54 % des souches de sérovar 1/2 et 77 % des souches de sérovar 4. Les phages ont une activité lytique spécifique de sérovar dont la détermination doit précéder toute lysotypie. La lysotypie, élargie aux cinq espèces de *Listeria* avec de nouveaux phages, n'a pas permis d'établir de relation phagovar-sérovar-hôte-origine géographique.

G - Diagnostic indirect

La recherche d'anticorps dirigés contre les antigènes 0 et H des types 1 et 4b est possible par agglutination lente en tube. La réaction est comparable à celle utilisée pour les *Salmonella* : agglutination 0 granuleuse, agglutination H floconneuse. L'interprétation des résultats devra toujours tenir compte du tableau clinique et du contexte épidémiologique car il existe des communautés antigéniques entre *Listeria*, Staphylocoques et Entérocoques. L'élévation des anticorps agglutinants est souvent tardive et même un taux élevé (> 1/320) n'est pas significatif, des taux élevés étant retrouvés chez des sujets sans antécédents de listériose.

TABLEAUffl
SÉROVARIÉTÉS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES. MURRAYA GRAYI*
ET ESPÈCES VOISINES

DESIGNATION	ANTIGENES O	ANTIGENES H
PATERSON		
SEELIGER		
DONKER VOET		
1	I II (III)	A B
1/2a	I II (III)	A B C
1/2b	I II (III)	B D
2	I II (III)	B D
3a	I II (III) IV	A B
3b	II (III) IV	A B C
3c	II (III) IV	B D
4	(III) (VI) VII IX	A B C
4b	(III) V VI VII IX	A B C
4c	(III) V VI VII IX	A B C
4d	(III) V VI VII IX	A B C
4e	(III) V VI VII IX	A B C
4f	(III) V VI VII IX	A B C
<i>Listenaspec</i>	(III) V VI VII IX	A B C
1	(III) V VI VII IX	A B C
6	(III) V VI VII IX	A B C
7	(III) V VI VII IX	A B C
<i>L. grayi</i> (ssp <i>sra</i>) <i>i</i>	(III)	E
(ssp <i>murrayi</i>)	(III)	E

Plus encourageant sont les résultats obtenus en dosant les anticorps dirigés contre la listériolysine 0 (LLO), même si cette enzyme comporte une antigénicité croisée avec streptolysine 0, pneumolysine et perfringolysine ; dans l'expérience de Berche : par titrage en dot blot, les anticorps anti LLO sont retrouvés à un titre > 1/100 chez 96 % des patients et 12 à 16 % des contrôles.

Malgré ces progrès récents, l'isolement des *Listeria* reste le meilleur moyen de diagnostic.

VII - AUTRES ESPÈCES

Les autres espèces de *Listeria* sont elles aussi (à l'exception de *L. grayi* isolée chez le seul chinchilla) largement distribuées dans la nature. *L. ivanovii* est hémolytique et pathogène chez l'animal (ovins) et a été rarement rencontrée chez l'homme. *L. innocua* et *L. welshimeri* ne sont pas hémolytiques et n'ont pas de pouvoir pathogène connu. *L. seeligeri* est faiblement hémolytique et dénuée de pouvoir pathogène expérimental, mais un cas de méningite humaine chez un sujet sans déficit immunitaire a été décrit. Ces espèces sont présentées dans le tableau I.

VIII - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

L. monocytogenes est une espèce sensible aux antibiotiques efficaces sur les bactéries à Gram positif. Les principaux antibiotiques actifs sont les bêta-lactamines avec une bonne activité des pénicillines, surtout **ampicilline**, et une mauvaise activité des céphalosporines en particulier celles de troisième génération. Sont aussi actifs, les aminosides (surtout gentamicine et tobramycine), les tétracyclines, l'érythromycine, le chloramphénicol. Les quinolones de seconde génération ont une activité réduite sur *L. monocytogenes*. Des résistances ont été rencontrées vis-à-vis des pénicillines, de l'érythromycine, de la rifampicine et du sulfaméthoxazole - triméthoprime.

Le traitement de choix est l'association ampicilline + aminoglycoside qui permet d'avoir *in vitro* le meilleur effet bactéricide.

Il n'existe pas de vaccin permettant de conférer une protection tant chez l'homme que chez l'animal. Aussi la prévention repose essentiellement sur des mesures individuelles pour la contamination directe et la surveillance de la qualité des denrées alimentaires, autant de mesures difficiles à observer en raison de la distribution de la bactérie dans la nature et sa résistance.

Il est recommandé aux femmes enceintes et aux immunodéprimés d'éviter l'ingestion de végétaux crus, de lait cru ou mal pasteurisé ainsi que des fromages frais ou à pâte molle.

BIBLIOGRAPHIE

- AUDURIER A., BERCHE P., « *Listeria* », in *Bactériologie Médicale*, Le Minor L., Véron M., Flammarion, Paris 1990, 844-858.
- BEH, 1987, n° 8, 39, 48
- BEH, 1989, n° 12, 31, 39-
- BERCHE P., REICH K.A., BONNICHON M. *et al.*, « Détection of antilisteriolysine 0 for serodiagnosis of human listeriosis », *Lancet*, 1990, **i**, 624-627.
- COURTIEU A.L., ESPAZE E.P., REYNAUD A.E., *Listeriose*, Compte-rendus du 9e symposium international sur les problèmes de listerioses. Université de Nantes, 1986.
- FARBER J.-M. PETERKIN P. I. « *Listeria monocytogènes*, a food-borne pathogen », *Microbiol. Rev.*, 1991, **55**, 476-511.
- GAILLARD J.L., BERCHE P., SANSONNETTI P., « Transposon mutagenesis as a tool to study the rôle of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogènes* », *Infect. Immun.*, 1986, **52**, 50-55.
- GAILLARD J.-P., BERCHE P., FREHEL C., GOUIN E., COSSART P., « Entry of *L. monocytogènes* into Cell is mediated by Intemalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. », *Cell*, 1991, **65**, 1127-1141.
- GELLIN B.C., BROOME C.V., « La listériose », *J.A.M.A.*, **14**, 1989, 628-638.
- HUMBERT G., DUVAL C., FESSARD C., MEUNIER M., LEDOUX A., « Aspects actuels des listerioses en France », (à propos d'une statistique de 824 cas), 1ère partie, 2ème partie, « Listerioses de la femme enceinte et listerioses néo-natales », *Lyon médical*, 1977, **237**, 257-289 et 455-468.
- REYNAUD A.E., ESPAZE E.P., COURTIEU A.L., « Évaluation de l'activité des antibiotiques sur *Listeria* », *Path. Biol.*, 1986, **34**, 1091-1095.
- ROCOURT J., « *Listeria* et listériose humaine. La décennie 1979-1989 » *Ann. Inst. Pasteur*, 1990, **1**, 25-30.
- ROCOURT J., CATIMEL B., « Caractérisation biochimique des espèces du genre *Listeria* », *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1985, **A 260**, 221-231.
- ROCOURT J., SEELIGER H.P.R., « Distribution des espèces du genre *Listeria* », *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1985, **A 259**, 317-330.
- SEELIGER H.P.R., « Modern taxonomy of the *Listeria* group and relation to its pathogenicity », *Clin. Invest. Med.*, 1984, **7**, 217-221.

Chapitre IX

ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

HISTORIQUE

E. rhusiopathiae a été isolé par Koch en 1878 et décrit par Pasteur et Thuillier en 1882 comme étant la bactérie responsable de la maladie rouge du porc, maladie transmissible contre laquelle ils préparent un vaccin vivant atténué. Rosenbach, en 1884, a isolé chez l'Homme, à partir de lésions cutanées, une bactérie identifiée comme celle décrite par Pasteur et Thuillier. La maladie humaine a été décrite par Baker à la fin du siècle. La mise au point du sérum anti-rouget dès 1891 et de vaccins avec des bactéries vivantes virulentes ou atténuées ont été, avant l'ère des antibiotiques, des moyens de lutte très efficaces contre la maladie chez l'animal (le porc plus particulièrement).

I - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU GENRE

E. rhusiopathiae est la seule espèce du genre *Erysipelothrix*. Il s'agit d'un bacille fin, droit ou légèrement incurvé, de taille variable : 0,2-0,4 x 2,5 μm de long pour la forme « courte », mais pouvant se présenter sous forme de longs filaments de plusieurs dizaines de μm . Les bactéries sont non sporulées, non capsulées, immobiles, à Gram positif, aéro-anaérobies facultatives et négatives pour les tests catalase et oxydase. Elles présentent une faible activité fermentative.

Ce genre génétiquement homogène (G+C p100 entre 36-38) fait partie des bactéries à Gram positif non sporulées de forme régulière comme d'autres genres, *Lactobacillus*, *Listeria*, pouvant être rencontrés chez l'homme.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

E. rhusiopathiae est une bactérie ubiquitaire largement distribuée dans la nature. Elle peut être isolée chez les mammifères, les oiseaux et les poissons. Le porc (30 à 50 % de porteurs sains) est probablement l'espèce la plus fréquemment touchée (rouget du porc), mais des épizooties peuvent aussi atteindre d'autres espèces animales, mammifères domestiques et sauvages, oiseaux d'élevage. Chez les poissons, la bactérie peut être isolée dans le mucus recouvrant la surface du corps, mais ne provoque pas d'infection.

La bactérie est aussi présente dans l'eau et le sol où elle semble persister plusieurs années, performance remarquable pour une bactérie non sporulée et en fait une bactérie « tellurique ». De même, la bactérie persiste plusieurs années dans les cadavres d'animaux et plusieurs mois dans les viandes fumées et salées.

La contamination humaine survient après contact avec des animaux infectés. La **maladie est avant tout professionnelle**, lors de manipulation d'animaux ou de carcasses de porcs, de volailles, de poissons et donc observée chez des vétérinaires, bouchers, employés d'abattoirs, mais aussi éleveurs et pêcheurs. La porte d'entrée cutanée, au niveau des mains, est la plus fréquente. Les portes d'entrée buccale et digestive sont beaucoup plus rares.

III - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

E. rhusiopathiae est l'agent du rouget du porc, maladie aiguë septicémique avec des manifestations cutanées et articulaires ou subaiguë et chronique avec des localisations à l'endocarde et aux articulations.

Chez l'homme, la forme la plus fréquente est la **forme cutanée localisée** ou érysipéloïde de Baker et Rosenbach. Après une incubation courte de 2-3 jours, le point d'inoculation (petite plaie, excoriation) est le siège d'une zone érythémateuse, chaude, sensible, prurigineuse, donnant une impression de tension et de brûlure. Cette zone s'étend progressivement, donnant un placard rouge vineux, légèrement en relief, mais plus clair et affaissé en son centre, bordé par un bourrelet périphérique plus violacé. La lésion localisée à la main peut concerner toute la face dorsale de la main et est accompagnée d'adénopathies épitrochléennes et axillaires. Il n'y a jamais de suppuration et la guérison spontanée peut être observée en quelques semaines.

Les **formes septicémiques** sont rares, survenant d'emblée ou après une forme cutanée. Elles sont le plus souvent associées à une endocardite ou à une arthrite septique et surviennent chez des sujets prédisposés. Les **autres localisations** (pulmonaires, méningées, pleurales) sont rares également.

Certains produits élaborés par *E. rhusiopathiae* sont susceptibles de jouer un rôle **dans** la virulence du germe tels que hyaluronidase et neuraminidase.

IV - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Le diagnostic direct sera envisagé, le diagnostic indirect ayant un intérêt limité.

A - Les produits pathologiques

L'hémoculture est le prélèvement essentiel lors de septicémie. Dans la forme cutanée, s'il y a une phlyctène, on ensemence le liquide ; si la lésion est sèche, la bactérie est localisée au niveau du bourrelet dans les couches dermo-épidermiques et l'isolement du germe est difficile. Pour avoir les meilleures chances d'isoler la bactérie, il faut réaliser un prélèvement au bistouri au niveau du bourrelet (côte de melon, sans faire saigner).

Le germe peut aussi être isolé à partir du liquide articulaire **ou du LCR chez l'homme**.

Chez les animaux vivants, l'isolement se fait à partir d'hémocultures. A partir d'animaux morts, il faut utiliser des milieux d'enrichissement supplémentés avec des antibiotiques ou des inhibiteurs des autres bactéries.

B - Examen direct

L'examen microscopique est rarement positif sur la biopsie cutanée. En culture, *E. rhusiopathiae* est un bacille droit ou légèrement incurvé, à Gram positif, immobile, non capsulé, non sporulé. De grandes variations de taille sont observées :

0,2-0,3 x 1 à 5 J.m dans les cultures jeunes et filaments de plusieurs dizaines de μm dans les cultures âgées. Sous forme de longs filaments, il prend l'aspect de touffes de cheveux (d'où une partie de son nom : thrix).

C - Culture

La culture est favorisée par la présence de glucose ou de sérum et par un pH légèrement alcalin. *E. rhusiopathiae* est aéro-anaérobie facultatif, plus volontiers micro-aérophile lors de l'isolement.

Il existe une forme S et une forme R. La forme S correspond aux formes courtes et donne des colonies fines (1 mm en 24-48 heures), lisses, bombées, brillantes, transparentes, à bords nets, devenant opaques après plusieurs jours. Les longs filaments correspondent à la forme R qui donne des colonies plates, opaques, à surface mate et rugueuse, à bords irréguliers (colonies de *Bacillus anthracis* en miniature). La dissociation des colonies dans les deux sens peut être observée.

Sur gélose au sang les colonies provoquent une hémolyse de type alpha parfois intense, mais l'hémolyse n'est jamais de type bêta.

La température optimale de culture est de 30-37°C, mais la culture est possible entre 5 et 42°C.

Le germe pousse lentement et faiblement en milieu usuel, sa croissance est favorisée par l'addition de sang, de sérum, d'ascite ou de glucose.

D - Identification - Pouvoir pathogène expérimental

Dépourvu d'oxydase et de catalase, ce genre bactérien a une faible activité métabolique.

Le glucose et le lactose sont acidifiés sans production de gaz ; le rhamnose, le saccharose, le mannitol et l'esculine ne sont pas modifiés. Il n'y a pas de production d'indole en eau peptonée et les nitrates ne sont pas transformés.

La bactérie dépourvue d'uréase, produit lentement de l' H_2S sur milieu au sous-acétate de plomb ou sur milieu de Kligler-Hajna. En gélatine sur piquêr profonde, la culture de *E. rhusiopathiae* donne une image en cure-pipe caractéristique, sans liquéfaction de la gélatine (à 22-25°C)

Deux espèces, la souris et le pigeon sont particulièrement sensibles à l'infection expérimentale. Chez la souris l'injection par voie intrapéritonéale ou sous-cutanée de 0,1 ml d'une culture de 24 heures provoque la mort en 24-48 heures. La bactérie est retrouvée au niveau de tous les organes (foie, rate... et est particulièrement visible sur les décalques de rein) et dans le sang du cœur.

E - Diagnostic différentiel

E. rhusiopathiae est une bactérie rarement rencontrée en bactériologie médicale courante. Le diagnostic différentiel n'en mérite que plus d'attention. Plusieurs espèces de bacilles à Gram positif non sporulés doivent être envisagés (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Listeria*) et même cocci à Gram positif (*Streptococcus*). Un tableau présentant les principaux caractères différentiels entre ces espèces se trouve au chapitre « *Listeria* ». Les caractères à prendre en compte, outre la morphologie et le type respiratoire sont : la catalase, l'oxydase, les températures de croissance, la culture sur milieux enrichis ou non, l'hydrolyse de l'esculine, la production d' H_2S , la mobilité, la culture en milieu acide (MRS), le métabolisme glucidolytique et protéolytique.

Le pouvoir pathogène expérimental chez la souris éventuellement avec un test de protection par le sérum spécifique peut compléter l'identification et le diagnostic différentiel.

F - Classification - Sérotypes

Des antigènes thermolabiles spécifiques d'espèce et thermostables spécifiques de type ont été identifiés. Les antigènes spécifiques de type sont de nature polysaccharidique et permettent de définir 22 sérotypes (sérovars). Les sérotypes 1 et 2 sont les plus fréquents.

Il existe au moins un antigène de groupe et, chez certaines souches, un antigène vaccinant et un antigène hémagglutinant ont été décrits.

V - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Le traitement repose sur l'antibiothérapie ; la pénicilline est l'antibiotique de choix. Les souches sont sensibles aux tétracyclines, aux macrolides, au chloramphénicol, à la streptomycine.

Dans les formes sévères (septicémie, endocardites) une association est recommandée : pénicilline G / streptomycine ou ampicilline / gentamicine. Le traitement doit être prolongé plus d'un mois ; les rechutes ne sont pas exceptionnelles. La prophylaxie se limite aux précautions à observer par ceux qui, par leur profession sont en contact avec des animaux malades ou porteurs de germes ou avec des produits d'origine animale susceptibles d'être contaminés par le bacille du rouget.

BIBLIOGRAPHIE

- BRISOU J., DENIS F., « Genre *Erysipelothrix* Rosenbach 1909 ». in *Bactériologie Médicale*, Dumas J., Flammarion, Paris, 1972, 557-566.
- FRELAND C., « Les infections à *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Revue générale à propos de 31 cas de septicémie avec endocardite relevés dans la littérature ». *Path. Biol.*, 1977, 25, 345-352.
- LEMARTE C., COTTIN J., MAHAZA C., CARBONNELLE B., *Erysipelothrix rhusiopathiae* : 4 nouvelles observations de septicémie. *Med. Mal. Infect.*, 1991, 21, 660-664.
- PHILIPPON A., PAUL G., « *Erysipelothrix rhusiopathiae* ». in *Bactériologie Médicale*, Le Minor L., Véron M., Flammarion, Paris, 1990, 859-866.
- REBOLI A.C., FARRAR W.E., « *Erysipelothrix rhusiopathiae* : an occupational pathogen ». *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, 2, 354-359.

Chapitre X

BACILLUS

GÉNÉRALITÉS

Le genre *Bacillus* comprend des bactéries en forme de bâtonnets, généralement mobiles, sporogènes. Ces bacilles sont à Gram positif, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs.

Le genre *Bacillus* comprend une vingtaine d'espèces, mais on s'intéresse essentiellement à *B. anthracis*, en raison de son pouvoir pathogène (animaux, homme) et à *B. cereus* (intoxication alimentaire).

Néanmoins, depuis quelques années, de nombreuses publications rendent d'autres espèces de *Bacillus* responsables d'infections chez les immunodéprimés (bactériémies, méningites, méningo-encéphalites, pneumonies, endocardites).

1 - CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE

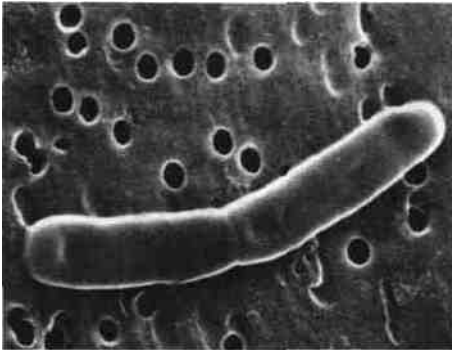
Les espèces du genre *Bacillus* sont classées sur leur morphologie et la position de leurs spores. Cette classification divise le genre *Bacillus* en 3 groupes :

- Groupe 1 Bacilles à spores ne déformant pas le corps microbien,
- Groupe 2 Bacilles à spores déformantes, ovales,
- Groupe 3 Bacilles à spores déformantes, rondes.

A l'intérieur de ces groupes, les espèces et les variétés se distinguent par des caractères morphologiques et physiologiques.

II - PRINCIPAUX CARACTÈRES DU GENRE *BACILLUS*

A - Morphologie



Mobile par ciliature péritriche, à contrôler à partir d'un bouillon (*B. anthracis* est toujours immobile).

La coloration de Gram théoriquement positive peut être négative (le groupe 1 garde mieux la coloration).

La coloration simple à la fuchsine diluée permet de mieux apprécier les formes, les dimensions, la présence de vacuoles cytoplasmiques dues à des inclusions lipidiques.

Les *Bacillus* sont rarement capsulés, sauf *B. anthracis* dans certaines conditions.

Une gélose sans peptone est le milieu le plus favorable à la sporulation. La spore mûre est ovale ou ronde. Son diamètre est inférieur ou supérieur à celui du bacille. Sa localisation est centrale, paracentrale, subterminale ou terminale. Dans certaines espèces il existe des inclusions parasporales. Parfois on note la présence de cristaux de protéines.

La résistance aux agents physico-chimiques est faible pour les formes bacillaires, facilement tuées par le vieillissement et la chaleur (1 h à 55°C) et les antiseptiques.

Elle est plus élevée pour les spores (40 mn à 120°C). *B. subtilis* compte parmi les plus résistants.

B - Caractères cultureux

La plupart des espèces se développent mieux à 28-33°C qu'à 37°C, mais beaucoup d'espèces tolèrent des différences thermiques marquées.

Les déterminations des températures seuil de croissance sont réalisées sur gélose inclinées incubées au bain marie.

Les milieux de culture usuels permettent la croissance de la plupart des espèces du genre *Bacillus*.

Les espèces ont chacune leurs exigences propres et souvent relativement homogènes : utilisation d'azote ammoniacal pour les uns, des acides aminés pour les autres, etc...

Les milieux favorables ou hostiles utiles pour l'identification sont :

- gélose nutritive à pH 6,
- pomme de terre : culture ou non,
- bouillon hypersalé.

C - Caractères biochimiques généraux

Métabolisme respiratoire

catalase (+), oxydase (±)

aérobies stricts ou anaérobiose facultative suivant les espèces.

Nitrate réductase

Elle est présente ou non suivant l'espèce.

Attaque des hydrates de carbone

En milieu complexe, l'acidification est souvent masquée. Il faut donc employer un milieu minéral gélose (milieu de Smith, Gordon, Clark), enrichi d'extrait de levure.

L'acidification ou non du glucose, arabinose et xylose suffisent généralement pour l'identification.

Production d'acétoïne (acétyl-méthyl-carbinol)

Sa production sur le milieu usuel de Clark et Lubs n'est pas toujours bonne. Il vaut mieux utiliser un milieu glucose, peptoné sans phosphate. La température favorable à la production varie suivant les espèces (32°C, 37°C et 45°C).

Autres caractères à étudier

- Hydrolyse de l'amidon, de la caséine, de la gélatine,
- Hydrolyse de la lécithine ; *B. subtilis* possède une phospholipase qui hydrolyse la lécithine en diglycéride et phosphorylcholine (opacification). Souvent, la réaction est R (= restreinte), c'est à dire très localisée sous la culture. Il faut donc parfois enlever les colonies pour la mettre en évidence.
- Indole : rarement positive.
- Uréase.

BACILLUS ANTHRACIS

HISTORIQUE

B. anthracis est responsable du « charbon », connu depuis l'antiquité.

- 1823 : Barthélémy procède à la première transmission expérimentale à des moutons.
- 1848 - 1850 : Rayer et Davaine décèlent dans le sang « charbonneux » des « petits corps filiformes ».
- 1860 : Delafond réalise la culture de la bactérie.
- 1880 : Pasteur, Roux et Chamberland atténuent la bactérie par la chaleur.
- 1881 : Expérience de Pouilly-Le-Fort : Pasteur prouve l'efficacité de son vaccin anti-charbonneux.

1 - HABITAT

La spore confère une très grande résistance dans les milieux extérieurs. Ce sont des germes telluriques mais que l'on rencontre aussi dans l'eau et dans l'air. *B. anthracis* est largement distribué dans le monde. Les animaux malades disséminent le germe ; le sol constitue le réservoir (champs, étables, prés) ; les cadavres et les produits d'origine animale (peaux, poils, os,...) participent à la pollution des terrains et peuvent contaminer l'homme.

II - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie et structure

Gros bacille (5-6 μm x 1 μm). Immobile (différent des autres *Bacillus*).

Dans les produits pathologiques, il se présente sous forme de courtes chaînettes.

En culture : chaînes longues en « canne de bambou »

Gram positif. Extrémités carrées.

1. La capsule

Les souches virulentes de *B. anthracis* sont capsulées. La capsule n'est produite *in vivo* ou en culture que dans certaines conditions (sang, sérum, bicarbonate de sodium, CO₂). Les souches non-capsulées sont avirulentes.

2. La spore.

Elle est ovoïde, non déformante. *B. anthracis* appartient au groupe 1.

La sporogénèse se fait en présence d'O₂, entre 18°C - 42°C et en atmosphère humide, dans des milieux pauvres, sans peptone.

B - Caractères cultureux

B. anthracis se développe bien sur milieux usuels.

Anaérobie, il préfère la présence d'oxygène. Température optimum : 30°C - 35°C (15°C - 43°C) ; pH 7 - 7,4 (6 - 8,5).

Sur gélose nutritive inclinée, les colonies sont R à contours irréguliers. Sur gélose au sérum, les colonies sont S (en raison de la production d'une capsule).

- En bouillon ordinaire et en eau peptonée : formation de flocons au fond du tube avec surnageant clair.

C - Caractères biochimiques

1. Pouvoir protéolytique

Il est peu marqué.

La liquéfaction de la gélatine en culot, après piqûre est lente.

Elle donne un aspect en « sapin renversé ».

Le lait est coagulé lentement et digéré lentement.

Sérum liquide : gélification puis liquéfaction.

Sérum coagulé : digestion lente.

L'hémolyse est légère et apparaît lentement.

2. Pouvoir glucidolytique

Il fermente : glucose, maltose, saccharose, lévulose, tréhalose et dextrine. Lactose (-), galactose (-), arabinose (-).

Les autres sucres sont attaqués de manière inconstante.

3. *B. anthracis* ne possède nippenicillinase, ni uréase.

Il est H₂S (-). Les nitrates sont réduits en nitrites.

D - Produits élaborés

B. anthracis élabore la toxine charbonneuse. C'est une toxine de nature protéique, qui est composée de 3 protéines distinctes : le facteur I = facteur œdématogène (adénylate-cyclase), le facteur II = antigène protecteur, le facteur III = facteur léthal (PM = 82 000).

Les facteurs II et III doivent être associés pour entraîner la mort de la souris, du rat ou du cobaye. L'injection intradermique des facteurs I et II entraîne des lésions cutanées chez le cobaye et le lapin.

L'action toxique des diverses souches peut varier suivant la production respective de ces 3 facteurs, et ainsi, certaines souches sont très œdématogènes et d'autres peu.

La production de la toxine répond à un déterminisme plasmidique.

E - Structure antigénique

1. La capsule

Elle est polypeptidique et intervient dans la virulence de la bactérie. Elle empêche la phagocytose, inhibe le pouvoir bactéricide du sérum et rend le sang incoagulable.

Les anticorps anticapsulaires ne sont pas protecteurs chez l'homme.

2. Les antigènes somatiques

Ils peuvent être étudiés par réaction de précipitation (réaction d'Ascoli).

3. La toxine

Elle provoque la formation d'anticorps neutralisants. Il existe des communautés antigéniques entre *B. anthracis* et certains autres *Bacillus*, mises en évidence par immunodiffusion (ex. avec *B. subtilis*, *B. megaterium* et *B. cereus*).

F - Lysotypie

B. anthracis est sensible à différents bactériophages. La lysotypie peut être utilisée dans le diagnostic différentiel entre *B. cereus* et *B. anthracis* :

- phages du groupe A actifs sur *B. anthracis*, inactifs sur *B. cereus*
- phages du groupe AC actifs sur *B. anthracis* et *B. cereus*
- phages du groupe C inactifs sur *B. anthracis*, actifs sur certains *B. cereus*.

III - POUVOIR PATHOGENE NATUREL

A - Chez les animaux

On distingue des formes subaiguës, aiguës et suraiguës. Le charbon peut être « interne » ou plus rarement « externe ». Les formes cliniques varient suivant les espèces animales :

Mouton : forme suraigue (mort en quelques heures)

Cheval et Boeuf : forme aiguë (souvent fatale en 1 à 2 jours)

Porc : charbon externe forme subaiguë (oedème de la gorge).

Dans le charbon interne animal, les lésions macroscopiques sont celles d'une septicémie. Le sang est noir, poisseux, incoagulable ; on observe une splénomégalie et une hématurie. Dans le charbon externe, on note une tumeur centrée sur un paquet ganglionnaire.

Les lésions microscopiques sont représentées par une accumulation de bacilles dans les capillaires.

B - Chez l'homme

7. Charbon externe

Le charbon est rarement rencontré chez l'homme en France, mais on estime qu'il y a au niveau mondial chaque année entre 20 000 et 100 000 cas de charbon (Afrique, Asie surtout).

La lésion typique est la "pustule maligne", qui siège au point de pénétration du bacille (main, bras, face).

Cette papule érythémateuse évolue vers une vésicule, puis un escarre noirâtre lui succède. L'évolution est le plus souvent favorable. Très rarement, il y a apparition d'un « oedème malin » envahissant.

Le charbon cutané est une maladie professionnelle (fermiers, vétérinaires, bouchers, mégissiers...).

2. Le charbon interne

Il est rare. Il peut prendre différentes formes :

- la forme pulmonaire : par inhalation de poussières après contact avec de la laine,
- la forme gastro-intestinale : après ingestion de viande contaminée,
- la méningite charbonneuse.

Ces formes ont un pronostic beaucoup plus sombre et conduisent souvent à la mort, parfois avant d'avoir instauré une thérapeutique efficace.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Le cobaye est très sensible à *B. anthracis*. Après inoculation, la mort survient en deux jours environ.

V - PATHOGÉNIE ET IMMUNITÉ

Après pénétration dans les tissus, les spores germent et donnent naissance à des bacilles qui s'encapsulent, se multiplient et pénètrent dans les ganglions lymphatiques afférents. Cette rétention ganglionnaire est temporaire puis les bacilles passent alors dans le sang (bactériémie). La rate fixe les bacilles. Lorsque sa capacité de fixation est dépassée, les bacilles se déversent massivement dans le sang et s'y multiplient (septicémie tardive).

La mort est due à l'action de la toxine charbonneuse. L'injection de toxine charbonneuse au cobaye produit des troubles analogues.

Après la guérison, le sujet possède des anticorps protecteurs induits par le facteur II. Les souches non-capsulées, de virulence modérée, produisent de la toxine et sont vaccinales.

VI - ÉPIDÉMIOLOGIE

Le charbon existe pratiquement dans toutes les parties du monde, mais surtout en Asie et en Afrique. Il existe des fluctuations saisonnières de l'incidence de la maladie avec un maximum en été, notamment durant les étés chauds et secs.

A - Les matières virulentes

Ce sont principalement les animaux malades et leurs produits de sécrétion et d'excrétion.

Les cadavres sont des sources de bacilles. La virulence des cadavres non autopsiés disparaît en quelques jours car la spore ne peut pas se former.

Peaux, poils, crins, laine sont dangereux pour l'homme.

Sang, muscles, os (farines, poudres) sont dangereux pour l'animal et l'homme.

Le sol souillé est un réservoir important et permanent (80 ans).

Les spores enfouies peuvent être ramenées en surface par les vers de terre ou les inondations.

B - Réceptivité

Les espèces animales n'ont pas la même réceptivité. Par ordre décroissant de réceptivité, on trouve les herbivores, les omnivores, les carnivores, les oiseaux.

Chez l'homme, la profession est déterminante. Le charbon est une zoonose professionnelle (tanneurs, bouchers, dockers).

C - Modalité de la transmission

7. Infection des animaux

Elle se fait essentiellement par voie digestive (ingestion d'herbes, de fourrages, de viandes polluées).

Il y a donc des possibilités de contamination locale (prés, champs maudits) ou à distance (transmission par oiseaux). Le commerce de poudre d'os importée de pays où le charbon est fréquent (Inde) peut amener l'apparition du charbon animal dans des régions indemnes.

2. Infection de l'homme

Elle se réalise par voie cutanée. Elle atteint : éleveurs, vétérinaires, ouvriers d'abattoirs et d'équarrissage, bouchers, tanneurs, dockers. En dehors de cet aspect professionnel, il peut survenir une contamination accidentelle (ingestion de viande provenant d'animaux malades).

VII - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Il est souvent orienté par l'épidémiologie : région (animaux) ou profession (homme).

A - Prélèvements

1. Animal

- Fragments d'organes,
- Os long,
- Os broyés, aliments composés, peaux,...

2. Homme

- Prélèvement de lésion ou de pustule,
- Sang, LCR...

B - Examens bactériologiques

1. Frottis de sang ou d'organe

Présence de bacilles volumineux, en petites chaînes.

A la coloration de Gram, *B. anthracis* apparaît comme de grands bacilles, à bouts

plats (3-5 u.m / 1-1,25 u.m). Il apparaît comme de courtes chaînettes dans les échantillons biologiques. Les spores sont rarement présentes.

⁹ 2. Culture

al Prélèvement monomicrobien

Milieux usuels (bouillons d'hémoculture, gélose au sang...)

bl Prélèvement polymicrobien

Avec des prélèvements polymicrobiens (ex. aliments composés...) on sélectionne les spores de *B. anthracis* par chauffage à 80°C, 5 mn avant l'ensemencement.

Milieux sélectifs

- Milieu de Pearce et Powell : gélose nutritive à 40 u.g/ml d'hématine et 60 u.g/ml de lysozyme, incubée à 40°C.
- Milieu de Knisely : gélose à l'extrait de cœur à 30 U/ml de polymyxine, 40 u.g/ml de lysozyme, 300 u.g/ml d'EDTA et 40 u.g/ml d'acétate de thallium.

En culture, les chaînes sont plus longues (cannes de bambous). Présence d'une spore centrale à subterminale non déformante.

Sur gélose au sang, on observe des colonies non hémolytiques. Les colonies sont du type R sur gélose au sang, TSA ou gélose nutritive, en forme de « tête de méduse ». Elles sont non-capsulées.

La sub-culture doit être faite sur un milieu contenant 0,5 % de bicarbonate de sodium et incubée dans 5 % de CO₂. Les souches virulentes produisent alors une capsule, et les colonies deviennent muqueuses. Cette formation de capsule est favorisée par addition au milieu de 0,7 % de sérum-albumine bovine.

Des anticorps fluorescents peuvent être utilisés pour détecter les bacilles encapsulés directement dans les tissus, sur les cultures, ou sur un frottis sanguin. (Les anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-capsule sont disponibles au CDC).

On peut identifier directement les colonies de *B. anthracis* sur la gélose. Un anticorps anti-toxine (Facteur II) est déposé dans un puits à 5 mm d'une colonie suspecte. Après une nuit à 4°C on observe une bande de précipitation entre la colonie et l'immunsérum.

B. anthracis peut également être identifié à l'aide de galeries d'identification miniaturisées prêtes à l'emploi.

C - Diagnostic différentiel avec les autres *Bacillus*

1. L'un des éléments de base est le caractère de mobilité.

***B. cereus* et *B. thuringiensis* sont mobiles. *B. anthracis* est immobile.**

2. *B. anthracis* est sensible à la pénicilline, pas les autres *Bacillus*

3. La vitesse d'hydrolyse du para-nitro-phényl-gluco-pyranoside ou maltoside par *B. anthracis* est augmentée par la présence dans le milieu de 1 % de Triton X-100, alors qu'elle est retardée pour *B. cereus*, *B. mycoides* ou *B. thuringiensis*.

4. La sensibilité au bactériophage gamma

Seul *B. anthracis* y est sensible.

Le diagnostic différentiel entre *B. anthracis* et *B. cereus* peut être complété par les caractères suivants :

TABLEAU 1

	<i>B. anthracis</i>	<i>B. cereus</i>
Mobilité	–	+
Capsule (<i>in vivo</i>)	+	
Colonies sur gélose-sérum	S	R
Gélatine	digestion lente	digestion rapide
Lait toumesolé	coagulation lente	coagulation rapide
Lécithinase	±	+++
Hémolyse	- ou ±	+++
Salicine	- ou lentement +	rapidement +
Pénicilline	sensible	résistant
Sensibilité aux phages	AetAC	ACetC
Dose létale pour le cobaye	faible dose suffisante	forte dose nécessaire

E - Inoculation à l'animal

Le pouvoir pathogène expérimental est précieux pour apporter un diagnostic de certitude. On utilise le cobaye (600 g), dont on rase les flancs et sur lesquels on fait des scarifications. Le prélèvement (polymicrobien, c'est à dire : aliments composés, morceau de cadavre,...) est alors déposé sur la peau.

Lorsque le prélèvement est monomicrobien (étude d'une souche), l'injection se fait par voie sous-cutanée.

L'animal meurt dans une attitude naturelle, on recherchera le bacille du charbon sur des frottis d'organes (rate).

F - Diagnostic indirect

1. Réaction d'Ascoli

On révèle les antigènes polysaccharidiques thermostables de *B. anthracis* dans un prélèvement par une réaction de précipitation avec un sérum anti-charbonneux.

Technique : Le fragment d'organe est broyé au mortier avec 5 à 10 fois son poids d'eau physiologique, chauffé à 100°C pendant 5 minutes et filtré. Dans un capillaire on dépose du sérum anti-charbonneux, puis le filtrat sans mélanger. Un précipité se forme à l'interface lorsque la réaction est positive.

2. Recherche d'anticorps *anti-Bacillus*

Chez les convalescents du charbon par précipitation ou fixation du complément

3. Allergie

On peut mettre en évidence un état d'allergie à *B. anthracis* par injection intra-dermique de 0,1 ml « d'anthraxine ». On observe une réaction locale au bout de 24 heures.

VIII - TRAITEMENT

Animal : pénicilline

Homme : pénicilline + sérothérapie dans les cas graves. Les résistances à la pénicilline sont exceptionnelles.

Streptomycine et tétracyclines ont été proposées.

En cas d'œdème malin ou de "charbon interne" la pénicilline G doit être administrée à fortes doses (20 millions UI/j chez l'adulte).

IX - PROPHYLAXIE

A - Prophylaxie sanitaire

Elle est difficile et illusoire en raison de la persistance des spores dans les terres polluées. On peut simplement essayer de ne pas créer de nouvelles zones dangereuses en surveillant les importations d'animaux et de produits d'origine animale en provenance de pays ou de régions infectés, ou en les traitant par différentes techniques (chaleur, rayons gamma, sulfure de sodium). En région infectée, on doit détruire les cadavres d'animaux charbonneux par incinération ou enfouissement dans des fosses contenant de la chaux vive. La prophylaxie de la maladie humaine est liée à celle de la maladie animale.

B - Prophylaxie médicale

Chez l'animal, la prophylaxie du charbon repose sur l'injection annuelle d'une suspension de spores d'une souche atténuée non-capsulée de *B. anthracis* en présence d'adjuvant.

Chez l'homme, les essais de vaccination n'ont pas dépassé le stade expérimental.

Le succès de la lutte contre le charbon animal repose sur une vaccination régulièrement appliquée aux espèces sensibles en zone polluée, associée à des mesures sanitaires de destruction des cadavres en cas d'apparition de la maladie. Cette maladie figure en France dans la liste des maladies animales réputées contagieuses et dans la liste des maladies professionnelles indemnisables pour les professions exposées.

BACILLUS CEREUS

GENERALITES

Bacillus cereus appartient au Groupe 1 du genre *Bacillus*. Gram (+), aéro-anaérobie facultatif, mobile (\pm), nitrate (+), catalase (+), mannitol (-) (cf. *B. anthracis*). Il cultive entre 10 et 45°C avec un optimum à 30-35°C (voir caractères généraux du genre *Bacillus*).

Ce germe est largement répandu dans la nature, dans l'air et le sol, il peut contaminer les aliments par ses spores.

B. cereus est responsable d'intoxications alimentaires après prolifération massive du germe dans un aliment contaminé.

Deux types d'intoxication sont décrits :

- Le premier type, correspondant à la production d'entérotoxine *in vivo*, ressemble à une toxi-infection due à *Clostridium perfringens* : après une incubation de 8 à 16 h, il apparaît une diarrhée profuse, accompagnée de douleurs abdominales, de nausées. Les symptômes régressent en 24 h.
- Le deuxième syndrome, correspondant à l'ingestion d'entérotoxine préformée dans l'aliment, est caractérisé par des vomissements très violents : l'incubation peut être courte (30 mn à 5 h). La régression des signes cliniques est également rapide.

I - TOXINES ET ENZYMES SÉCRÉTÉES

B. cereus produit des toxines et des enzymes variées, des hémolysines dont l'une d'elle est la céréolysine, des protéases, des phospholipases. Les enzymes expliquent le caractère fulminant de certaines infections oculaires dues à *B. cereus*.

B. cereus produit également des toxines plus spécifiques quant à leur action sur le tube digestif.

A - Une entérotoxine protéique de 50 kDa, encore appelée « toxine diarrhéigène ».

~ Cette toxine agit directement sur le tractus digestif. Elle modifie la perméabilité vasculaire et provoque une accumulation liquidienne dans la lumière intestinale. Elle possède une action nécrotique et une action cytotoxique. Elle est antigénique et thermolabile.

B - Une toxine, encore appelée toxine émétisante de 5 kDa

Elle n'est pas antigénique et thermostable. Sa production serait caractéristique de certaines souches, liée au stade de la sporulation et non produite au delà de 40°C.

II - RISQUES D'ORIGINE ALIMENTAIRE

A - Les sources de germes

B. cereus est un saprophyte de l'homme et de l'animal. Il est fréquent dans le sol, sur les végétaux, les épisées, les céréales (particulièrement le riz).

B - Aliments incriminés

De nombreux aliments peuvent être à l'origine des intoxications : viandes, légumes crus ou cuits, préparations à base de viande et de végétaux, pasta, sauces (sauces tomates instantanées), soupes, laits, crème à la vanille, purées de pomme de terre déshydratées (consommées après une conservation plus ou moins longue). Dans le cas de syndromes diarrhéiques, les taux de contamination des aliments par *B. cereus* sont voisins de 10^7 à 10^9 germes/gramme.

Cette multiplication des germes est due à des conditions de conservation inadaptées. Le riz préparé à l'avance, réchauffé à une température trop basse pour tuer les spores, après une période de conservation à température ambiante pouvant atteindre 2 à 3 jours est considéré comme l'aliment caractéristique à l'origine de vomissements (saison chaude, cuisine orientale).

A noter qu'en France, sur 611 épisodes d'intoxications alimentaires identifiés en 1989, *B. cereus* n'a été identifié qu'une fois, mais sa place dans cette pathologie est sûrement sous estimée. Elle représente néanmoins 5 % des cas d'intoxications alimentaires aux USA.

III - DIAGNOSTIC

L'isolement de *B. cereus* dans les selles n'est pas suffisant.

Le diagnostic bactériologique est basé sur la numération des germes dans l'aliment et sur l'identification de l'espèce *B. cereus*.

Les milieux de dénombrement et d'isolement utilisent les propriétés les plus caractéristiques de la bactérie : propriétés hémolytiques, présence d'une gélatinase, d'une lécithinase, résistance à la polymyxine, absence d'action sur le mannitol. Ces propriétés sont utilisées conjointement dans un milieu à base de jaune d'œuf, de mannitol et de polymyxine. Ces épreuves suffisent pour un diagnostic présomptif.

La confirmation de *B. cereus* doit être faite par d'autres caractères : mobilité du germe, l'hémolyse (alpha ou bêta), et la résistance à la pénicilline (*B. anthracis* est sensible à la pénicilline).

B. cereus est différencié de *B. mycoides* par des tests d'agglutination de lectines : *B. cereus* n'est agglutinable que par les lectines de soja, alors que *B. mycoides* est également agglutiné par des lectines d'*Hélix pomatia*.

Enfin une classification sérologique, basée sur la spécificité des antigènes flagellaires permet de mettre en évidence la prédominance de certains sérotypes dans les cas d'intoxication, le sérovar 1 est le plus souvent isolé, sans doute en raison de sa plus grande résistance à la chaleur.

IV - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Un traitement n'est pas justifié, tout au plus un anti-émétique peut être nécessaire. La prophylaxie de cette intoxication est d'une part un problème d'hygiène alimentaire collective où l'utilisation de produits déshydratés se développe (cuisines, restaurants) et d'autre part d'hygiène industrielle dans le domaine agro-alimentaire.

BACILLUS OPPORTUNISTES

D'autres espèces de *Bacillus* peuvent parfois jouer le rôle de germes opportunistes et on sait que durant ces dernières années, une augmentation significative des infections nosocomiales a été constatée. Traditionnellement, dans un laboratoire de bactériologie, ces *Bacillus* étaient, peut-être hâtivement, assimilés à des contaminants de la peau ou de l'air. Actuellement, on est parfois amené à leur accorder de l'importance dans une large variété d'infections (Tableau III) où cependant il faut bien préciser le terrain (immunodéprimés, cancers) et faire la preuve de la responsabilité du *Bacillus*, en particulier lors d'isolements répétés dans un produit normalement stérile. Ont été impliqués dans diverses manifestations : *B. brevis*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*.

Récemment des auteurs américains ont tout particulièrement insisté sur la progression des endophtalmies à *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*...).

TABLEAU n
DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL DE QUELQUES *BACILLUS*

	<i>B. cereus</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>
Mobilité	V	+	V	+
Anaérobiose	+	+	-	-
Gaz en glucose	-	+	-	-
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	+
VP	+	+	-	+
$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	+	+	V	+
Croissance en 7 % NaCl	+	+	+	+
Culture à 50°C	-	+	-	+
Lécithinase	+	-	-	-

V = variable

TABLEAU m
TABLEAUX CLINIQUES IMPUTABLES AUX "*BACILLUS* OPPORTUNISTES"

Espèce	Manifestations cliniques
<i>B. alvei</i>	septicémie, méningite
<i>B. brevis</i>	ulcère de cornée
<i>B. cereus</i>	bactériémie, pneumonie, ostéomyélite, endocardite, endophtalmie
<i>B. circulans</i>	méningite
<i>B. coagulans</i>	abcès du cerveau
<i>B. laterosporus</i>	septicémie
<i>B. licheniformis</i>	bactériémie
<i>B. megaterium</i>	méningite, septicémie
<i>B. pumilus</i>	méningite, bactériémie
<i>B. sphaericus</i>	péritonite, pleurésie, péricardite, méningite, bactériémie
<i>B. subtilis</i>	méningite, otite, mastoïdite, infection urinaire, bactériémie, pneumonie, endocardite, abcès de l'orbite, panophtalmie, kératite, iridocyclite
<i>B. thuringiensis</i>	ulcère de cornée

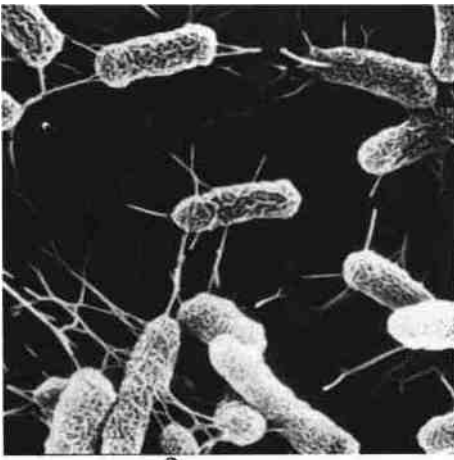
BIBLIOGRAPHIE

- BERKELEY R.C.W., LOGAN N.A., SHUTE L.A. and CAPEY A.G., « Identification of *Bacillus* species », in *Methods in Microbiology*, T. Bergan éd., 1984, vol. 16, Académie Press, London, pp. 292-328.
- DONNIO P.Y., LE DEAUT P., SCHUTTLER C., AVRIL J.L., « Caractérisation et signification clinique des souches de *Bacillus* isolées par hémocultures », *Méd. Mal. Infect.*, 1987, **13**, 110-112.
- DOYLE R.J., KELLER K.F., EZZELL J.W., « *Bacillus* », in *Manual of Clinical Microbiology*, E. H. Lennette and coll. eds, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985, pp. 211-215.
- TOMA B., « *Bacillus* », in *Bactériologie Médicale*, L. Le Minor et M. Véron eds., 1989, Flammarion Médecine Sciences, Paris, pp. 879-886.

SECTION IV — ENTEROBACTERIACEAE

GENERALITES SUR LES ENTEROBACTERIACEAE

1 - CLASSIFICATION ET DÉFINITION



La famille des *Enterobacteriaceae* est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs.

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6 μm de long et 0,3 à 1 μm de large ;
 - Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles ;
 - Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire ;
 - Acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz ;
- Ne possédant pas d'oxydase (à la différence des *Vibrio* et *Pasteurella*) ;
 - Réduisant les nitrates en nitrites.

Les *Enterobacteriaceae* ont un G + C % du DNA compris entre 38 et 60 mol %.

Les travaux de taxonomie génétique basés sur l'hybridation de DNA ont entraîné la distinction récente de nouveaux genres et de nouvelles espèces dont beaucoup n'ont pas de pouvoir pathogène défini.

Voici les genres décrits dans la famille des *Enterobacteriaceae* :

Buttiauxella, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Moellerella*, *Koserella*, *Leclercia*, *Morganella*, *Obesumbactenum*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Tatumella*, *Xenorhabdus*, *Yersinia*, *Yokenella*.

Seuls les genres et les espèces qui ont un intérêt médical reconnu seront envisagés plus loin. Une centaine d'espèces d'*Enterobacteriaceae* sont individualisées, mais 23 d'entre elles représentent 99 % des souches isolées en clinique.

II - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

Parmi les nombreuses espèces *d'Enterobacteriaceae* certaines sont trouvées dans l'environnement, d'autres chez les végétaux ou les animaux. Il en est qui ont un pouvoir phyto-pathogène. Parmi les espèces qui peuvent être isolées chez l'homme, certaines (*Shigellid*) sont constamment pathogènes. D'autres espèces se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections chez des malades fragilisés. Leur identification est une part importante du travail du laboratoire de bactériologie.

III - CARACTÈRES CULTURAUX

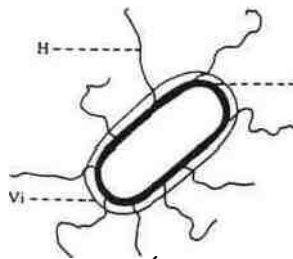
Les *Enterobacteriaceae* se développent bien dans un bouillon ou sur une gélose ordinaire incubés 18 heures à 37°C.

- *Les formes S* (smooth) sont l'aspect habituel au sortir de l'organisme.
Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm de diamètre.
Le bouillon est trouble de façon homogène.
- *Les formes R* (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.
Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.
En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.
- *Les colonies muqueuses* sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces, notamment *Salmonella paratyphi B*.
- *Les colonies naines* s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires.

IV - CARACTÈRES ANTIGÉNIQUES

L'identification des *Enterobacteriaceae* se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination du sérotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des agglutinations croisées non spécifiques.

- *Les antigènes O*
Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipo-polysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.



SCHÉMA

situant les antigènes O, H et Vi chez les Entérobactéries

Les réactions d'agglutination où ils interviennent se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation. La spécificité 0 est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

- *Les antigènes H*

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches **mobiles**. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutination où ils interviennent se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

- *Les antigènes K*

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes rendent la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums 0. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures.

Les antigènes d'adhérence ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes K (K88, K99).

- *Antigène Kunitz*

Cet antigène commun aux *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique.

Des antisérums dirigés spécifiquement contre chacun des antigènes bactériens sont préparés en utilisant la méthode de l'absorption spécifique des anticorps de Castellani. Des anticorps qui se sont fixés sur l'antigène bactérien correspondant forment des agglutinats. Après centrifugation, il ne reste plus dans le surnageant que les anticorps qui n'ont pas été en contact avec l'antigène.

BIBLIOGRAPHIE

FARMER III, J.J., DAVIS B.R., HICKMAN-BRENNER F. W., et al., « Biochemical identification of new and species biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens », *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **21**, 46-76.

IZARD D., HUSSON M.O., VINCENT P., LECLERC H., « Méthodes rapides et **automatiques** d'identification des Entérobactéries », *Ann. Biol. Clin.*, 1983, **41**, 419-426.

RICHARD C., « Techniques de recherche d'enzymes utiles au diagnostic des bactéries à Gram négatif », *Ann. Biol. Clin.* 1978, **36**, 407-424.

RICHARD C., « Nouvelles espèces de *Enterobacteriaceae* », *Bull. Inst. Pasteur*, 1984, **82**, 205-277.

RICHARD C., « Entérobactéries rares et inhabituelles », *Bulletin de l'Ass. An. El. Inst. Pasteur*, 1990, 124, 17-25.

Chapitre XI

ESCHERICHIA COLI

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines catégories de *E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés.

I - HABITAT

E. coli est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Dans l'intestin, *E. coli* est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante, présente à raison de 10^7 à 10^9 corps bactériens par gramme de selles. Cette population bactérienne ne représente qu'environ 1 % de celle des anaérobies (voir encadré sur la flore du tube digestif).

La recherche de *E. coli* dans l'eau d'alimentation (colimétrie) est faite pour apprécier sa potabilité. La présence de *E. coli* dans l'eau est le témoin d'une contamination fécale récente et la rend impropre à la consommation.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pouvoir pathogène pour l'homme

1. Infections intestinales

L'existence de diarrhées à *E. coli* est connue depuis 1940.

Ces diarrhées sont dues à des souches de sérotypes particuliers qui provoquent soit des cas sporadiques, soit des petites épidémies.

Les différents syndromes cliniques sont dus à des *E. coli* différents dont nous précisons plus loin le support de la virulence. On reconnaît aujourd'hui 4 types de souches responsables de diarrhées :

al Les souches entéropathogènes ou "Entero-Pathogenic E. coli" (E.P.E.C.).

Elles étaient responsables, dans les années 50, de diarrhées infantiles graves ou toxicoses survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E. coli* G.E.I. (des gastro-entérites infantiles) sont plus rarement rencontrées aujourd'hui, elles sont alors isolées de cas sporadiques. Elles appartiennent à des sérotypes particuliers : OUI, 026, 055, 086, 0125, 0119, 0127, 0126, 0128 et, plus rarement en Europe, 0124, 0114 et 0142.

bl Les souches entérotoxigènes ou "Entero-Toxigenic E. coli" (E.T.E.C.).

Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent principalement chez les voyageurs (Turista). Elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays.

cl Les souches entéro-invasives ou "Entero-Invasive E. coli" (E.I.E.C.).

Elles sont isolées de syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif.

dl Les souches entéro-hémorragiques ou "Entero-Hemorrhagic-Colitis E. coli" (E.H.E.C.).

Ces souches ont été décrites en Amérique du Nord où elles ont été responsables d'épidémies de diarrhée aqueuse puis hémorragique. Elles appartiennent à un sérotype particulier 0157. Un produit alimentaire contaminé peut être à l'origine de la diffusion de l'épidémie. Ces souches sont aussi responsables du syndrome hémolytique-urémique.

TABLEAU 1
PROPRIÉTÉS DES *E. COLI*/RESPONSABLES DE DIARRHÉES

<i>E. COU</i>	ENTÉROPATHOGÈNES EPEC	ENTÉROHÉMORRAGIQUES EHEC	ENTÉROTOXIQUES ETEC	ENTÉROINVASIFS EIEC
DIARRHÉE CIBLE SÉROTYPES	aiguë et chronique enfants moins de 1 an 026,055,086,0111, 0114*, 019, 0125, 0126,0127,0128, 0142*	sanglante intox, alimentaire 0157	liquide enfants et voyageurs 06, 08, 015, 020, 025, 027,063, 078, 080, 085,0115,0128, 0148,0159	dysentérique adultes et intox, alim. 028,0112,0124,0136 0143,0144, 0147, 0152, 0164
MÉCANISME TOXINES PLASMIDE TAILLE	adhérence dysentérique? OUI	pas invasif dysentérique OUI	attachement LT/ST OUI	envahissement dysentérique OUI
	55-72Md	30-75 Md		140Md

2. Infections extra-intestinales

a/ Infections urinaires

La majorité des infections urinaires de la femme jeune observées en pratique médicale de ville est due à *E. coli*. Les souches provenant de la flore fécale contaminent les urines par voie ascendante. C'est la classique « colibacillose ».

cl Méningites néo-natales

Un tiers d'entre elles sont dues à *E. coli*. La plupart des souches en cause possèdent un antigène polysaccharidique de type K1 dont la composition est proche de l'antigène capsulaire de *N. meningitidis* de type B.

dl Suppurations diverses

Les *E. coli* de la flore fécale peuvent être en cause dans des péritonites, des cholécystites, des salpingites et des suppurations post-opératoires.

Toutes ces infections, si elles sont insuffisamment traitées, peuvent être à l'origine de septicémies.

B - Pouvoir pathogène pour l'animal

Certaines souches de *E. coli* productrices de toxines ou possédant des propriétés invasives sont particulièrement pathogènes pour les animaux et provoquent des diarrhées chez les veaux ou les porcelets. Ces diarrhées sont, par leur fréquence et la mortalité qu'elles entraînent, causes de pertes économiques importantes.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Au cours des dernières décennies, des progrès importants ont été faits dans la compréhension des mécanismes contribuant à la virulence de certaines catégories de *E. coli*.

A - E.T.E.C.

Pour être pathogènes, ces souches doivent à la fois posséder des adhésines et produire des entérotoxines.

1. Les adhésines ou antigènes d'adhésion

Ce sont des structures filamenteuses (appelées *pili oufimbriae*) de nature protéique, qui entourent les corps bactériens à la manière d'une fourrure. Elles permettent aux bactéries d'adhérer spécifiquement aux bordures en brosse des entérocytes de la partie haute de l'intestin grêle. Les souches qui les possèdent peuvent alors s'y maintenir malgré les mouvements péristaltiques.

Ces adhésines confèrent aux bactéries la propriété d'hémagglutiner les globules rouges. Cette hémagglutination est mannose-résistante ; elle persiste en présence de mannose contrairement à celle due aux pili communs.

Les adhésines sont antigéniques. Au moyen d'immun-sérums on peut en distinguer plusieurs types :

- CFA/I, CFA/II et CFA/III (Colonization Factor Antigen) ont été décrits chez des souches responsables de diarrhées souvent cholériformes.
- K 88 est présent chez des souches responsables de diarrhées du porcelet.
- K 99 est trouvé chez des souches de diarrhées du veau ou de l'agneau.

Ces différentes adhésines sont codées par des plasmides transférables qui peuvent porter simultanément les gènes codant la production d'entérotoxines.

2. Les entérotoxines'

Les souches d'E.T.E.C. peuvent produire deux types d'entérotoxines mises en évidence par leur « pouvoir de dilater l'anse de lapin ligaturée », par l'accumulation de liquide qu'elles provoquent lorsqu'elles sont injectées dans l'intestin grêle.

- L'entérotoxine LT, thermolabile

C'est une protéine, inactivée par un chauffage à 60°C. Elle est mise en évidence par son pouvoir cytopathogène sur les cellules Y 1 de surrénale de souris ou sur les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO).

Sa structure et son mécanisme d'action sont très voisins de ceux de la toxine de *Vibrio cholerae*. La sous-unité A₁ stimule l'adénylate-cyclase en augmentant la concentration d'AMP cyclique des entérocytes. La sous-unité B est responsable de sa fixation qui élève la concentration d'AMP cyclique intra-entérocytaire à un récepteur membranaire, le ganglioside Gml.

- L'entérotoxine ST, thermostable

Elle est moins bien connue et plusieurs formes de l'entérotoxine ST existent. Elle est mise en évidence par l'accumulation de liquide après injection dans l'estomac du souriceau nouveau-né (test de Dean). Elle stimule l'activité guanylate-cyclase en augmentant le GMP cyclique des entérocytes.

En fonction des plasmides qu'elles hébergent, les souches d'E.T.E.C. produisent, soit l'une, soit les deux entérotoxines. La diarrhée est plus intense avec les souches qui produisent à la fois LT et ST qu'avec celles qui produisent uniquement ST.

TABLEAU
PROPRIÉTÉS DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE
ET DES TOXINES LT ET ST DES *ESCHERICHIA COU*

Propriétés	<i>V. cholerae</i> 01	LT	ETEC	ST
Poids moléculaire	83000	86000		1 500 à 5 000
Sous-unités	A et B	A et B		non identifiés
Récepteur cellulaire	ganglioside GM 1	ganglioside GM 1		non identifié
Mécanisme d'action	active l'adénylate-cyclase	active l'adénylate-cyclase		active la guanylate-cyclase
Immunogénicité	proche de LT	proche de la toxine cholérique		non antigénique
Mise en évidence	Modèles animaux, cultures de cellules et propriétés immunologiques	Modèles animaux, cultures de cellules et propriétés immunologiques		Modèles animaux seuls
Déterminisme	Chromosomique	Plasmidique		Plasmidique

B E.I.K.C.

Ces souches pénètrent dans les cellules de la muqueuse intestinale où elles provoquent des ulcérations et des micro-abcès.

Le pouvoir invasif de ces souches peut être mis en évidence soit par le test de Sérény (kérato-conjonctivite après instillation d'une suspension bactérienne dans l'œil d'un cobaye), soit par leur aptitude à pénétrer dans des cellules HeLa en culture.

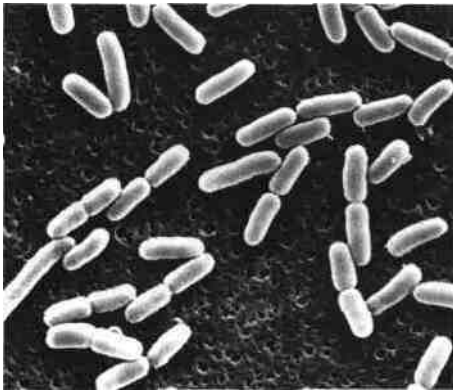
C - E.P.E.C.

Le mécanisme de leur pouvoir pathogène est mal connu. Ces souches ne produisent généralement ni entérotoxines ST, ni LT. Elles sont capables d'adhérer aux entérocytes par des mécanismes qui restent à préciser. Elles possèdent une toxine désignée comme Verotoxine (VT) parce qu'un surnageant d'une culture produit un effet cytotoxique irréversible sur des cellules Vero en culture. Les souches de E.H.E.C. produisent également une toxine VT, dont le rôle n'est pas clairement établi.

D - Souches d'infections urinaires

Les souches responsables d'infections urinaires, en particulier celles isolées de pyélonéphrites, possèdent des facteurs de virulence particuliers. La présence de fimbriae (de type P, de type 1), de certains antigènes O, de polysaccharides capsulaires (antigènes KI), la production d'hémolysine, d'aérobactine, et la résistance au pouvoir bactéricide du sérum (par le complément) sont les facteurs principaux.

IV - CARACTÉRISATION D'UNE SOUCHE DE *E. COLI*



E. coli possède tous les caractères décrits plus haut comme étant communs aux *Enterobacteriaceae*. Cette espèce est le plus souvent mobile.

A - Caractères cultureux et métaboliques

E. coli se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux géloses en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactoses, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques.

- Les principaux caractères positifs sont :
 - indole (+) (exceptions)
 - ONPG (+) (exceptions)
 - mannitol (+)
- Les caractères suivants sont positifs de façon moins constante : mobilité, LDC, ODC, sorbitol [les souches 0157:H7, E.H.E.C. sont le plus souvent sorbitol (-) et décarboxylases (+)], production de gaz lors de l'attaque du glucose.
- Sont toujours négatifs : inositol, urée, TDA, VP, gélatinase, citrate de Simmons. Les souches de *E. coli* entéro-invasives ont souvent une faible activité métabolique.

B - Diagnostic différentiel

- Trois autres espèces de *Escherichia* sont rarement rencontrées dans les prélèvements. Ce sont : *E. hermanii*, *E. fergusonii* et *E. vulneris*. Les caractères ci-dessous permettent de distinguer les différents *Escherichia*. *E. hermanii* est sorbitol (-) comme *E. coli* 0157:H7 et possède une bêta-lactamase comme les *Klebsiella*.

	Indole	ODC	Saccharose	Pigmentjaune	PGR	TTR
<i>E. coli</i>	+	d	d	-	d	-
<i>E. hermanii</i>	+	+	d	+	-	+
<i>E. fergusonii</i>	+	+	-	-	-	-
<i>E. vulneris</i>	-	-	-	±	-	-

Des souches de *E. coli* à la fois immobiles et agazogènes, antérieurement désignées comme *Aikalescens-Dispar*, peuvent parfois poser des problèmes d'identification avec les *Shigella*. La recherche de la lysine-décarboxylase et le test au citrate de Christensen sont généralement positifs avec les *E. coli*, alors qu'ils sont toujours négatifs avec les *Shigella*.

C - Caractères antigéniques

- Antigènes O, somatiques ou lipopolysaccharidique. Il existe environ 160 antigènes O différents. Au moyen d'immun-sérums spécifiques, il est possible de classer sérologiquement les souches de *E. coli* dans les groupes O. Cette sérotypie est la seule à être utilisée en routine pour reconnaître **notamment** les souches E.P.E.C..
- Antigènes K, capsulaires, polysaccharidiques. Environ 70 antigènes d'enveloppe différents ont été reconnus. Leur subdivision en antigènes L, A et B semble devoir être abandonnée. La majorité des souches responsables de méningites possèdent l'antigène K 1.
De ces antigènes capsulaires on rapproche les antigènes protéiques ou adhésines en rapport avec la présence de pili permettant l'adhérence aux bordures en brosse (K 88, K 99).
- Antigènes H ou flagellaires, protéiques. On en connaît 52 **types**. Ils ne sont présents que chez les souches mobiles.

V - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE INFECTION A *E. COLI*

A - Infections intestinales

Les selles doivent êtreensemencées sur un milieu gélose non inhibiteur pour *E. coli* : Drigalski, Mac Conkey, éosine-bleu de méthylène.

- *E.P.E.C.*

Leur recherche ne se fait que chez les enfants de moins de 1 ou 2 ans. **Leur** présence est sans signification chez les individus plus âgés.

Après 18 heures d'incubation à 37°C, cinq colonies suspectes d'être un *E. coli* (lactose (+)) sont examinées à l'aide d'un sérum nonavalent, contenant des anticorps dirigés contre les 9 sérotypes les plus fréquents en Europe. La recherche de l'agglutination peut être faite en tube ou sur lame. Sur lame, pour être positive une agglutination doit être rapide et se faire en moins de 5 secondes. Une agglutination positive avec le sérum nonavalent n'a qu'une valeur d'orientation et doit être précisée en utilisant des sérums monovalents.

- *E.T.E.C.*

Leur caractérisation, comme celle des E.I.E.C., n'est pas faite en routine. Elle est faite par des laboratoires spécialisés lorsque les données cliniques et épidémiologiques suggèrent leur utilité.

- La recherche des antigènes d'adhésion CFA/I et CFA/II est faite à l'aide d'antisérums spécifiques.
- L'entérotoxine LT est recherchée par inoculation d'un surnageant de culture sur des cellules Y 1 ou CHO. Différentes méthodes plus simples sont en cours d'évaluation : agglutination de particules de latex sensibilisées, immunoprécipitation en gel à l'aide d'un antisérum de lapin (Biken-test).
- L'entérotoxine ST est détectée par inoculation intra-gastrique du surnageant au souriceau nouveau-né.
- Le milieu de Mac **Conkey au sorbitol** permet la détection des souches *E. coli* 0157:H7 qui en général n'attaquent pas le sorbitol.

B - Infections urinaires

La recherche de germes se fait sur des urines prélevées au milieu du jet,ensemencées immédiatement ou conservées dans des conditions appropriées (+ 4°C ou milieu de transport).

La numération des bactéries permet de distinguer une infection urinaire authentique (nombre de bactéries supérieur à 10^5 /ml) d'une contamination par des bactéries urétrales lors de la miction (nombre de bactéries inférieur à 10^4 /ml).

Ici l'emploi d'une gélose C.L.E.D (Cystine-Lactose-Electrolyte-Deficient) est recommandé, car il évite l'envahissement de la culture par un éventuel *Protons* contaminant.

C - Autres infections

L'isolement d'un *E. coli* ne pose pas de problème technique particulier puisque cette bactérie se développe bien sur les milieux usuels.

VI - TRAITEMENT

Infections intestinales

Le traitement curatif d'une diarrhée aiguë est avant tout un traitement symptomatique par la réhydratation.

La diarrhée des voyageurs peut être prévenue par des mesures d'hygiène ou par la prise d'antibiotiques pour certains. Les fluoroquinolones ou le cotrimoxazole sont utilisés à titre curatif.

Autres infections

Les souches de *E. coli* sont généralement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles Gram négatif : amino-pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole. Néanmoins cette sensibilité doit toujours être vérifiée par un antibiogramme.

BIBLIOGRAPHIE

EVANS D.J., EVANS D.G., « Classification of pathogenic *Escherichia coli* according to serotype and the production of virulence factors, with spécial référence to colonization-factor antigens », *Rev. Infect. Dis.*, 1983, 5, S692-S701.

JALLAT C., AUBEL D., DARFEUILLE-MICHAUD A., JOLY B., Toxines et adhérence du colibacille dans les diarrhées, *Med. Mal. Infect.*, 1991, 21, 556-561.

JOHNSON J.R., « Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, 4, 80-128.

GROSS R.J., ROWE B., « *Escherichia coli* diarrhoeae », *J. Hyg. Camb.*, 1985, 95, 531-550.

ORSKOV I., ORSKOV F., « *Escherichia coli* extra-intestinal infections », *J. Hyg. Camb.*, 1985, 95, 551-575.

SANSONETTI P.J., « *Escherichia coli* entéropathogènes, données récentes sur la virulence », *Bull. Inst. Pasteur*, 1985, 83, 5-18.

A signaler : le numéro spécial du mois de mars 1987 de la revue Médecine et Maladies Infectieuses sur les colibacilles et leur pathologie.

ANNEXE

LA FLORE INTESTINALE NORMALE

Dans la flore colique le nombre de bactéries est d'environ 10^{10} bactéries par gramme de contenu intestinal.

La presque totalité de ces bactéries sont des anaérobies stricts : *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Clostridium*, ainsi qu'un grand nombre d'espèces qui ne sont pas répertoriées et sont désignées comme E.O.S. (Extremely Oxygen Sensitive).

Les bactéries aéro-anaérobies ne représentent qu'environ 1 %o de la flore totale. *Escherichia coli*, l'espèce prédominante parmi les *Enterobacteriaceae*, n'est présente qu'à raison de 10^7 corps bactériens par gramme. D'autres *Enterobacteriaceae* peuvent être retrouvées en quantité bien moindre : *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*. Les autres espèces bactériennes sont présentes à des taux de l'ordre de 10^3 bactéries par gramme ou moins. Ce sont : les entérocoques, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*. Quelques levures sont aussi présentes.

Deux événements sont susceptibles de modifier cet équilibre complexe et d'entraîner des troubles digestifs graves. Ce sont :

1. L'implantation dans l'intestin d'une espèce bactérienne pathogène qui ne s'y trouve pas à l'état physiologique : *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entérotoxigènes, *Vibrio cholerae*, etc...
2. La destruction par les antibiotiques de la majorité de la flore résidente physiologique ; cela permet la prolifération de l'une des espèces suivantes : *S. aureus* ou *Clostridium difficile*, *P. aeruginosa*...

Chapitre XII

SHIGELLA

Les *Shigella* sont des Entérobactéries responsables de la dysenterie bacillaire et de diarrhées qui constituent un problème majeur de santé publique dans les pays en voie de développement.

Elles sont caractérisées par leur faible activité métabolique et par leur parenté génétique avec *Escherichia coli* (les GC % sont très voisins).

1 - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES COMMUNS A TOUTES LES *SHIGELLA*

Outre les caractères généraux des *Enterobacteriaceae*, **les souches appartenant au** genre *Shigella* ont toutes les caractères communs suivants :

- Immobiles (bouillon en phase exponentielle).
- Pas de culture sur milieu au citrate de Simmons.
- Absence de LDC et de tryptophane-désaminase.
- Fermentation du glucose *sans* gaz (exceptions **avec** certains biotypes de *S. flexneri* 6 et *S. boydii* 13 et 14).
- Jamais de production d'H₂S.

II - CARACTÈRES DE CHAQUE ESPÈCE

Les quatre espèces du genre *Shigella* se distinguent entre elles par des caractères biochimiques et des caractères antigéniques, basés sur l'étude des antigènes O polysaccharidiques. Les caractères essentiels sont indiqués dans le tableau I.

- *S. dysenteriae* = sous-groupe A

Cette espèce est caractérisée par l'absence de fermentation du mannitol.

Il existe 10 sérotypes. *S. dysenteriae* type 1 ou bacille de Shiga possède une bêta-galactosidase très active, est indole (-) et, fait rare chez les *Enterobacteriaceae*, ne possède pas de catalase. Le bacille de Shiga est l'agent des grandes épidémies historiques survenues dans les armées en campagne ou les camps de réfugiés.

- *S. flexneri* = sous-groupe B

Cette espèce comporte 6 sérotypes et 2 variants.

- *S. boydii* = sous-groupe C
Cette espèce comporte 15 sérotypes.
- *S. sonnei* = sous-groupe D
Il n'existe qu'un seul sérotype. Cette espèce se distingue des autres par la présence d'une omithine-décarboxylase et par le fait que les souches ne produisent jamais d'indole. On peut subdiviser cette espèce en biotypes.

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *SHIGELLA*

Test	<i>S. dysenteriae</i> ¹	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Fermentation du Mannitol	-	+	+	+
Indole	.b	<i>d</i>	<i>d</i>	-
ONPG	d	-	<i>d</i>	+
ODC	-	-	-	+
Sérogroupe	A	B	C	D

a = le type 1 possède la particularité de ne pas avoir de catalase, ce qui est exceptionnel chez les *Enterobacteriaceae*

b = caractère positif avec les types 2,7 et 8.

d = caractère variable.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

A - Shiga-toxine

Connue depuis 1903 chez *S. dysenteriae* 1, elle est localisée dans l'espace périplasmique de la bactérie et libérée lors de la lyse de la bactérie. C'est une toxine protéique de 70 kDa, codée par des gènes chromosomiques, constituée d'une sous-unité A (32 kDa) et de 5 sous-unités B (7,7 kDa). La sous-unité B est composée de 69 acides aminés, identique à la sous-unité B de la toxine Shiga-like, type 1 ou Vérotoxine de *E. coli*). La structure multimérique de la Shiga-toxine est comparable à celle de la toxine cholérique et de la toxine LT de *E. coli*, mais sans présenter de communauté antigénique.

Les sous-unités B sont responsables de la liaison aux récepteurs cellulaires (glycolipidiques ou glycoprotéiques). La sous-unité A, après coupure par une enzyme protéolytique, est réduite en un fragment A1 à activité enzymatique qui est internalisé par endocytose. La cible est le ribosome, où par action sur EF1 (l'exotoxine A du *B. pyocyaneus* et la toxine diphtérique agissent sur EF2) au niveau, de la sous-unité 60S, la toxine provoque une inhibition de l'élongation de la chaîne peptidique et par conséquent une inhibition des synthèses protéiques.

La toxine exerce :

- un effet paralytique et létal après injection IV au lapin. L'action neurotoxique résulte de troubles neurologiques secondaires à des lésions des vaisseaux du cerveau et de la moelle épinière ;
- une action entérotoxique, se traduisant par une accumulation liquidienne hémorragique ;
- une action cytotoxique sur certaines cellules en culture (HeLa les plus sensibles, cellules KB, de rein de singe). Le rôle de la toxine dans la virulence de la bactérie et dans la dysenterie n'est pas clairement établi.

B - Vérotoxine

Différentes espèces bactériennes produisent une toxine caractérisée par son pouvoir cytotoxique pour les cellules Véro.

Cette toxine très voisine de la Shiga-toxine a été trouvée :

- chez des souches de *E. coli* responsables du syndrome hémolytique et urémique (maladie de Moskowitz), de colite hémorragique et chez des souches entéro-pathogènes (ECEP).
- chez d'autres espèces bactériennes : *S. Typhimurium*, *V. cholerae*, *Vibrio non-01* et *V. parahaemolyticus*.

C - Pouvoir entéro-invasif

Le pouvoir entéro-invasif est en relation avec la présence de plasmides communs aux différentes espèces de *Shigella* et aux *E. coli* entéro-invasifs (de 180 kb chez *S. sonnei*, de 220 kb chez *S. flexneri*). L'expression des gènes plasmidiques de virulence est sous le contrôle de la température : le phénotype invasif est exprimé à 37°C et est perdu de façon réversible à 30°C. Différentes protéines sont responsables du pouvoir invasif.

Le pouvoir entéro-invasif est mis en évidence expérimentalement par : le test de **Serény** (kérato-conjonctivite purulente dans les 48 h après instillation d'une suspension de bactéries dans l'oeil du cobaye) - la pénétration dans des cellules HeLa et la mort des cellules - coloration par le rouge Congo. Le lipopolysaccharide (LPS) participe à la virulence des *Shigella*.

La maladie humaine est la conséquence de l'invasion de la muqueuse du côlon. Les différentes étapes sont la pénétration dans les cellules épithéliales, la multiplication intra-cellulaire, et l'invasion des cellules voisines et du tissu conjonctif des villosités. Ceci entraîne une forte réaction inflammatoire provoquant abcès et ulcération du colon et l'apparition de sang et de mucus dans les selles. L'intestin grêle n'est habituellement pas concerné. L'infection est limitée à la muqueuse sans traverser la lamina propria. L'atteinte de la sous-muqueuse et la diffusion systémique sont exceptionnelles.

IV - ÉPIDÉMIOLOGIE

Le seul réservoir de *Shigella* est le tube digestif de l'homme. Ces bactéries ne font pas partie de la flore normale du tube digestif. Elles sont présentes dans les matières fécales des malades ou des porteurs sains (convalescents, entourage des malades). La shigellose est la plus transmissible des maladies bactériennes intestinales ; dix germes vivants peuvent provoquer la maladie chez un adulte sain.

La dissémination de la maladie se fait par des aliments, de l'eau de boisson contaminée par des matières fécales ou de personne à personne. Les shigelloses surviennent là où les conditions d'hygiène sont défectueuses. Le lavage des mains et l'amélioration de l'approvisionnement en eau sont les mesures qui réduisent la transmission fécale-orale.

En France, environ 1 000 souches sont reçues annuellement par le Centre National des *Shigella* de l'Institut Pasteur. Le plus grand nombre de souches est reçu en septembre-octobre. Cela s'explique par la température estivale et les retours de vacances en pays exotiques. *S. sonnei* est la plus souvent isolée. *S. flexneri* vient ensuite. *S. dysenteriae* et *S. boydii* sont rarement isolées en France. On peut observer de petites épidémies chez des nourrissons ou des vieillards vivant en collectivité.

Dans les pays en voie de développement, la shigellose endémique est due avant tout à *S. flexneri*. Le taux de morbidité est élevé. Les enfants de un à cinq ans sont particulièrement atteints. Dans certains pays, la mortalité est importante.

Une **pandémie** de shigellose due à *S. dysenteriae* 1 a commencé en 1969 en Amérique Centrale. Elle englobe maintenant une large région d'Afrique centrale et les pays du sous-continent indien. La souche en cause est résistante à de nombreux antibiotiques.

V - POUVOIR PATHOGÈNE

Une shigellose commence habituellement par une diarrhée aqueuse suivie après 24 à 48 heures par l'apparition de sang et de mucus dans les selles. Il y a de la fièvre, des douleurs abdominales et du ténesme.

Une déshydratation est possible mais dans une faible proportion des cas.

La mortalité, qui avec *S. dysenteriae* 1 peut dépasser 10 % des cas, malgré un traitement adapté, est due à différentes complications : cachexie, état pseudo-leucémique, iléus paralytique, perforation intestinale, prolapsus rectal.

La maladie est particulièrement grave quand elle se déclare après la rougeole ou quand il existe une malnutrition pré-existante. Les localisations extra-digestives sont peu fréquentes. Les moins rares sont les infections urinaires. On observe parfois des formes septicémiques, des arthrites, des méningites.

VI - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

A - Isolement de la bactérie

C'est la seule façon de faire le diagnostic de certitude de shigellose.

Coproculture :

C'est la méthode de choix. Elle se fait en ensemencant des selles fraîchement émises et des glaires muqueuses si elles en contiennent.

L'examen microscopique des selles met en évidence des polynucléaires qui sont témoins d'un processus invasif.

L'isolement de la bactérie se fait sur un milieu gélose sélectif non inhibiteur : Hektoen, Drigalski, Mac Conkey. Le milieu SS ne permet pas la croissance de certaines souches de *Shigella*. Il est donc à déconseiller. Il n'existe pas de milieu d'enrichissement efficace pour les *Shigella*.

Les colonies suspectes (lactose (-) et H₂S (-)) sont l'objet d'une caractérisation plus complète. Il importe de faire le diagnostic différentiel entre les *Shigella* et les « Aikalescens-dispar » qui sont des *E. coli* immobiles et ne produisant pas de gaz.

Deux caractères, la LDC et la croissance sur milieu au citrate de Christensen, sont toujours négatifs avec les *Shigella* alors qu'ils sont généralement positifs avec les « Aikalescens-dispar ».

Autres examens :

Hémocultures. Elles sont rarement pratiquées, mais peuvent être positives dans un faible pourcentage de cas.

Urines. Elles permettent l'isolement de la bactérie dans les cystites ou pyérites à *Shigella* qui sont rares mais non exceptionnelles.

B - Sérotypie ou typage sérologique d'une souche

Ce n'est qu'une fois le diagnostic de genre *Shigella* établi avec certitude que le typage antigénique peut être entrepris par agglutination sur lame. Les sérums agglutinants commercialisés sont :

1. Sous groupe A : 2 sérums polyvalents

Ce sous-groupe comporte 10 sérotypes mannitol négatifs, dont 2 sont exceptionnels (9 et 10).

Sérum A1 : *nti-Shigella dysenteriae* indole négatives : 1, 3, 4, 5, 6.

Sérum A2 : *smti-Shigella dysenteriae* indole positives : 2, 7, 8.

2. Sous groupe B : 1 sérum polyvalent, commercialisé sous le nom de **sérum anti-flexneri**.

Il agglutine les 6 sérotypes de ce sous-groupe

3. Sous-groupe C : 3 sérums polyvalents

- C1 : *mû-Shigella boydii* indole négatives : 1, 2, 3, 4.
- C2 : *anti-Shigella boydii* indole négatives : 8, 10, 14.
- C3 : *smti-Shigella boydii* indole positives : 5, 7, 9, 11, 15.

Le sérotype 6, étroitement apparenté à *Shigella sonnei*, phase II, est agglutiné par le sérum *anti-Shigella sonnei*.

4. Sous-groupe D' : 1 sérum mixte : D, commercialisé sous le nom de sérum mixte *anti-sonnei*.

Il agglutine les 2 phases de *Shigella sonnei*.

C - Sérodiagnostic

Il peut se faire par séro-agglutination, mais est dépourvu d'intérêt dans les syndromes dysentériques car il est trop tardif et sa spécificité est inégale selon les sous-groupes.

Il est parfois utile pour relier certains syndromes rhumatismaux à une infection à *S.flexneri*. Dans ces cas, il est souhaitable de prélever deux sérums, à deux semaines d'intervalle, pour observer une ascension du titre des agglutinines.

VII - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Shigella* sont irrégulièrement sensibles aux antibiotiques. L'ampicilline, les tétracyclines, la colistine, les sulfamides et le triméthoprime sont généralement actifs. Cependant, rappelons que c'est au cours d'une épidémie de shigellose que les plasmides de résistance multiple transférable ont été découverts au Japon. Aussi, aujourd'hui, le traitement doit être guidé par les résultats d'un antibiogramme.

VIII - VACCINS CONTRE LES SHIGELLA

Les vaccins injectables contenant des bactéries tuées ou les vaccins par voie orale à base de bactéries vivantes atténuées sont sans efficacité.

Par les techniques du génie génétique, il a été possible d'analyser avec précision les déterminants de la pathogénicité et de l'immunogénicité des *Shigella*. Des recherches sont en cours afin de produire un vaccin buccal vivant. Ces recherches se font dans les directions suivantes :

production « d'hybrides mutants » de *Shigella* atténués par incorporation de segments de gènes de *E. coli* ;
production de *E. coli* contenant des gènes de *Shigella* ;
utilisation de *Salmonella* Typhi atténuées contenant des séquences codantes de gènes pour la synthèse d'antigènes de *Shigella*.

BIBLIOGRAPHIE

- CANTEY J.R., « Shiga toxin, an expanding rôle in thé pathogenesis of infectious diseases », *J. Infect. Dis.*, 1985,**151**, 766-771.
- FORMAL S.B., HALE T.L., SANSONETTI P.J., « Invasive enteric pathogens », *Rev. Infect. Dis.*, 1983, 5, S702-S707.
- MAURELLI A.T., SANSONETTI P.J., « Genetic déterminants of *Shigella* pathogenicity », *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, 42, 127-150.
- O'BRIEN A.D., HOLMES R.K., « Shiga and Shiga-like toxins », *Microbiol. Rev.*, 1987, **51**, 206-220.
- RICHARD C., « Les Shigelles hier et aujourd'hui », *Bull. de l'Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur*, 1990,**125**, 18-28.

Chapitre XIII

SALMONELLA - CITROBACTER

HISTORIQUE

- En 1820, Bretonneau montra la contagiosité de la fièvre typhoïde qu'il appelait alors dothiéntérite.
- En 1880, Eberth observa le premier le bacille dans les organes d'un malade mort de typhoïde.
- En 1884, Graffky réussit la culture de ce bacille.
- En 1896, Widal montra que le sérum de malades atteints de fièvre typhoïde agglutinait des cultures du bacille d'Eberth. C'était là le premier séro-diagnostic, technique dont on connaît le succès ultérieur pour l'aide au diagnostic des maladies infectieuses.
- En 1930, Kauffmann et White développèrent une classification des bactéries voisines du bacille d'Eberth basée sur l'identification de leur antigènes.
- En 1939, Reilly montra le rôle du système neuro-végétatif dans la pathogénie de la typhoïde.

1 - TAXONOMIE ET NOMENCLATURE

Les travaux taxonomiques les plus récents ont montré que le genre *Salmonella* ne comprend qu'une seule espèce *Salmonella enterica* composée de 7 sous-espèces qui correspondent aux anciens sous-genre I, II, III et IV de Kauffmann. La dénomination *S. enterica* a été préférée à celle initialement proposée de *S. choleraesuis* qui désigne aussi un sérovar. Les différentes sous-espèces sont :

sous-espèce I	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i>
sous-espèce II	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>salamae</i>
sous-espèce IIIa	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>arizonae</i>
sous-espèce IIIb	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>diarizonae</i>
sous-espèce IV	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>houtenae</i>
sous-espèce V	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>bongori</i>
sous-espèce VI	<i>Salmoenlla enterica</i> subspecies <i>indica</i>

Ces sous-espèces sont elles-mêmes subdivisées en sérovars (ou sérogroupes) sur la base des constituants antigéniques (O, H et Vi). La sous-espèce I représente plus de 99,5 % des souches isolées en pathologie. La désignation des sérovars qui antérieurement correspondaient à des noms d'espèce, en particulier ceux de la

sous-espèce I, avait été choisie selon le syndrome (*S. typhi*), la spécificité d'hôte (*typhimurium*, *choleraesuis*) puis sur l'origine géographique de la première souche du nouveau sérovar (*dublin*). Ces dénominations ont été conservées, mais l'écriture en est modifiée : la sous-espèce n'est pas mentionnée car tous les sérovars sont de la sous-espèce I et le nom débute par une majuscule (*Salmonella* Typhimurium, *S. Montevideo*) et n'est plus écrit en italique. Les sérovars des autres sous-espèces sont désignés uniquement par leur formule antigénique (*S. salamae* 1, 9, 12 : 1, w : e, n, x).

En 1987, 2213 sérovars : 1299 dans la sous-espèce I, 445 dans la sous-espèce II, 296 dans la IIIb, 91 dans la IIIa, 59 dans la IV, 14 dans la V et 9 dans la VI étaient identifiés. Les souches de la sous-espèce I proviennent généralement d'animaux à sang chaud et cette sous-espèce est pratiquement la seule à avoir un intérêt médical. Les autres sous-espèces sont généralement isolées d'animaux à sang froid ou de l'environnement.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

S. Typhi et *S. Paratyphi A* sont strictement adaptées à l'homme. Il n'est pas possible de reproduire la fièvre typhoïde chez l'animal par administration *per os*.

La transmission de la fièvre typhoïde d'homme à homme se fait par l'intermédiaire d'eau ou d'aliments (coquillages) souillés par des selles de malades ou de convalescents, porteurs sains.

En France *S. Typhi* est plus souvent isolée que *S. Paratyphi*. Il n'y a plus d'épidémies importantes mais des foyers localisés ; cependant on peut estimer à plus d'un millier le nombre des cas observés dans une année. L'augmentation du nombre de cas contractés dans les pays méditerranéens est à souligner. Il n'existe pas en France de cas autochtones de salmonelloses dus à *S. Paratyphi A*. La contamination des malades se fait à l'étranger.

Les *Salmonella* autres sont avant tout des parasites du tube digestif de l'homme et des animaux. Les sérotypes qui, contrairement aux précédents n'ont pas de spécificité d'hôte, sont dits ubiquitaires. Après la maladie, certains sujets restent porteurs sains et éliminent pendant plusieurs mois des *Salmonella* dans leurs selles. Les *Salmonella* sont retrouvées dans le milieu extérieur, dans les eaux d'égout en particulier. Des *Salmonella* sont aussi fréquemment retrouvées dans les farines de poisson ou poudres d'os utilisées pour l'alimentation des animaux.

La contamination de l'homme se fait par voie buccale. La fréquence des infections à *Salmonella* est en augmentation. Elle est favorisée par le développement des repas pris en collectivité où les aliments sont préparés bien avant d'être consommés et dans lesquels les bactéries peuvent se multiplier.

S. Typhimurium est rencontrée dans tous les pays. Elle est la plus souvent identifiée au Centre National des *Salmonella* de l'Institut Pasteur. Elle est isolée chez l'homme, chez les animaux et dans l'environnement.

S. Typhimurium occupe la première place dans l'étiologie des toxi-infections alimentaires. Pratiquement toutes les denrées peuvent héberger quelques *Salmonella* ; mais les denrées d'origine animale jouent le rôle principal. Tout défaut dans la conservation des aliments (ce qu'il est convenu d'appeler la chaîne du froid) permet la multiplication des quelques *Salmonella* éventuellement présentes. L'ingestion de 10⁶ bactéries entraîne une toxi-infection alimentaire.

Certains sérotypes, jusqu'alors exceptionnellement isolés, peuvent avoir une diffusion épidémique importante. Ce fut le cas à partir de 1972 pour *S. Wien*. En 1984, *S. Goldcoast* a présenté une "bouffée", consécutive à la consommation de pâté contaminé. En 1985, *S. Bovismorbificans* a eu une diffusion importante en France. Depuis 1987, la fréquence d'isolement de *S. Enteritidis* augmente fortement pour être

en 1989 le deuxième sérovar le plus fréquemment isolé chez l'homme. Cette flambée d'infection à *S. Enteritidis* est préoccupante et correspond dans la majorité des cas à la consommation d'oeufs de poule. Les mesures de prévention doivent s'appliquer en aval, au niveau de l'utilisation des oeufs avec les précautions habituelles concernant la chaîne du froid pour les préparations sans cuisson, mais surtout en amont, au niveau de la production des oeufs, compliquée par la transmission verticale (voie transovarienne) de l'infection à *S. Enteritidis* (lysotype 33).

Les 15 sérovars les plus fréquents, représentant 84 % des souches isolées chez l'homme sont indiqués dans le tableau II.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

Les salmonelloses peuvent revêtir trois aspects :

A - Les formes septicémiques

Ce sont les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes dues à *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, B et rarement C. Ce sont des septicémies à point de départ lymphatique.

Chez le nouveau-né ou le jeune enfant, d'autres sérotypes comme *S. Panama* ou *S. Wien* peuvent être responsables de septicémies qui mettent en jeu le pronostic vital.

B - Les salmonelloses purement digestives

Les toxi-infections alimentaires à *Salmonella* se manifestent par des diarrhées, de la fièvre, et des vomissements. Les premiers signes surviennent 8 à 10 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. L'évolution de ces gastro-entérites est en règle générale spontanément favorable en quelques jours.

Les entérites à *Salmonella* s'observent principalement chez le jeune enfant. Des épidémies peuvent survenir dans des collectivités de nourrissons.

La fréquence des entérites à *Salmonella* au cours du S.I.D.A. est à noter.

C - Les formes extra-digestives

Elles sont plus rares ; infections urinaires, cholécystites, méningites, ostéomyélites, spondylodiscites, infections pulmonaires. Ces formes surviennent plus volontiers chez des malades immuno-déprimés. Les déficits enzymatiques des globules rouges et la drépanocytose sont des circonstances favorisantes.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

Au cours de la fièvre typhoïde, les *Salmonella* ingérées pénètrent dans les cellules des plaques de Peyer et colonisent les ganglions lymphatiques intestinaux. Elles disséminent par voie sanguine, en réalisant une septicémie à point de départ lymphatique. Au cours de la maladie il est possible de trouver des *Salmonella* dans les urines.

Les *Salmonella* peuvent se développer dans la bile et survivre dans les canalicules et la vésicule biliaire où il est difficile de les éradiquer. Leur persistance à ce niveau entraîne un état de portage chronique.

Une partie des corps bactériens en se lysant libère de l'endotoxine ou LPS qui atteint par voie sanguine les centres neuro-végétatifs, ce qui entraîne le tufos et le collapsus cardio-vasculaire. En injectant expérimentalement à des lapins de

l'endotoxine au voisinage du nerf splanchnique, Reilly a pu reproduire des lésions du tube digestif, montrant ainsi le rôle du système neuro-végétatif.

V - CARACTÈRES D'IDENTIFICATION

A - Caractères de la sous-espèce 1

Les *Salmonella* ont les caractères morphologiques culturels et métaboliques décrits plus haut comme étant communs à toutes les *Enterobacteriaceae*. Les caractères qui permettent d'identifier les souches appartenant à la sous-espèce 1 ou *S. enterica* subsp *enterica* sont les suivants :

- bacilles mobiles,
- produisant du gaz en glucose (sauf *S. Typhi*),
- lactose et ONPG négatifs,
- possédant une LDC et une ODC,
- utilisant le citrate de Simmons comme seule source de carbone,
- ne possédant ni uréase, ni TDA, ni gélatinase,
- ne fermentant pas le saccharose, le raffinose et la salicine,
- la réaction de Voges-Proskauer (VP) est négative.

Le phage 01 de Félix et Callow lyse 98 % des souches de *Salmonella* et pas les autres *Enterobacteriaceae*. La mise en évidence de cette lyse est simple. On procède comme pour un antibiogramme. Au lieu de déposer des disques d'antibiotiques à la surface de la gélose on y laisse tomber une goutte d'une suspension du phage 01.

Il est important de noter quelques **exceptions à ces caractères fondamentaux** :

- Un sérovar aviaire, *S. Gallinarum* est immobile ;
- *S. Paratyphi A* ne produit pas d' H_2S et est LDC négatif ;
- *S. Typhi* ne produit pas de gaz en glucose et produit peu ou pas d' H_2S ;
- *S. Typhi* et *S. Paratyphi A* n'utilisent pas le citrate de Simmons ;
- Le sérovar *S. Choleraesuis* ne produit pas d' H_2S .

B - Caractères des autres sous-espèces

En raison de leur faible incidence en bactériologie médicale nous renvoyons le lecteur intéressé à l'article de Le Minor, Véron et Popoff cité en bibliographie de ce chapitre. Indiquons seulement que ces sous-espèces se distinguent de la sous-espèce 1 par les caractères suivants : ONPG, gélatinase, utilisation du malonate et culture sur milieu au KCN. Ces quatre caractères sont négatifs simultanément pour les seules souches appartenant à la sous-espèce 1.

C - Diagnostic différentiel

Trois *Enterobacteriaceae*, commensales du tube digestif de l'homme, peuvent lors d'une identification sommaire être confondues avec les *Salmonella*. Ce sont *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* et *Proteus mirabilis*. Les caractères différentiels avec les *Salmonella* sont indiqués dans le tableau II.

- *Citrobacter freundii* n'a pas de LDC et est ONPG (+) ;
- *Hafnia alvei* ne produit pas d' H_2S , est VP (+) à 22°C et est généralement ONPG (+) ;
- *Proteus mirabilis* possède une uréase et une tryptophane-désaminase.
N'étant pas des *Salmonella*, aucune de ces trois espèces n'est lysée par le phage 01.

TABLEAU 1
DIAGNOSTIC BIOCHIMIQUE DES *SALMONELLA*

		<i>Salmonella</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>P.mirabilis</i>
<i>Milieu de</i>					
Hajna-Kliger	Glucose	+	+	+	+
	Gaz	+	+	+	+
		sauf <i>S. Typhi</i>			
	Lactose	-	-	d	-
	B-galactosidase	-	M ^(°)	[+]	-
	H ₂ S	+	-	[+]	+
	sauf <i>S. Paratyphi A</i> et <i>S. Choleraesuis</i>				
	LDC	+	+	-	-
		sauf <i>S. Paratyphi A</i>			
<i>Milieu</i>					
Mannitol-mobilité	Mannitol	+	+	+	-
	Mobilité	+	(à 37°)[-]	+	[+]
		sauf <i>S. Gallinarum</i>			
	Nitratase	+	(à 22°)+	+	+
<i>Milieu</i>					
urée-indole	Uréase	-	HO	-	+
	TDA	-	-	-	+
	Indole	-	-	-	-
C.S.	Citrate de Simmons	+	-(+)	[+]	d
Gly.	EP + 1 % glycérol	-(+)	+	+	+/(+)

Tableau dû à C.Richard

+ : positif en 1 ou 2 jours.

[+] : caractère positif de la majorité des souches.

(+) : positif entre 3 et 7 jours.

- : négatif.

[-] : caractère négatif de la majorité des souches.

d : différentes réactions suivant les souches.

(°) : en cas de réponse négative, rechercher la p-galactosidase à partir d'une culture de *Hafnia* sur milieu de Kligler incubé à 22°C.

(°°) : certaines souches de *Hafnia* possèdent une uréase.

TDA : tryptophane désaminase.

VI - CLASSIFICATION SÉROLOGIQUE

Elle est basée sur la détermination, par agglutination sur lame, des antigènes **0**, **H** et **Vi**. Il existe plus de 2 000 sérovars, mais avec un nombre limité de sérums agglutinants, tout laboratoire peut typer la majorité des souches de *Salmonella* qu'il isole. Le typage des sérovars rares nécessite l'intervention d'un laboratoire de référence.

A - Antigènes 0

La spécificité de chacun des 67 antigènes 0 répertoriés est déterminée par sa composition, c'est-à-dire par la structure des polysaccharides de la paroi bactérienne.

Les formes R. Ce sont des mutants, non pathogènes, qui ont perdu par délétion une grande partie de la chaîne polysaccharidique responsable de la spécificité 0. Ces souches ne sont plus sérotypables et sont auto-agglutinables dans de l'eau physiologique.

Les formes T (de transition). Ces souches sont rares. Elles donnent des colonies ayant l'aspect S, mais elles ont perdu leur spécificité O, comme les formes R.

Les bactériophages dits convertisseurs. Ils peuvent par lysogénie produire des modifications de la structure antigénique O des *Salmonella*. Les facteurs antigéniques O qui sont liés à une conversion phagique peuvent être présents ou absents. Ils sont soulignés dans le tableau de Kauffmann-White.

B - Antigènes H

Les flagelles sont constitués d'une molécule protéique, la flagelline, dont la composition en acides aminés détermine le type antigénique H. Cette composition est codée par un gène de structure H) pour la phase 1 et un gène H₂ pour la phase 2.

Certains sérotypes sont monophasiques. Ils ne peuvent synthétiser de la flagelline que d'une seule spécificité.

La plupart des sérotypes sont diphasiques. Ils peuvent synthétiser des antigènes H soit de la phase 1, soit de la phase 2.

Les antigènes de la phase 1 sont désignés par des lettres : a, b, c ... z. Comme l'alphabet n'y suffisait pas, les plus récemment reconnus sont désignés par un z suivi d'un nombre. Les antigènes de la phase 2 sont désignés par des chiffres.

Inversion de phase. Lorsque dans une culture, la majorité des bactéries est par exemple en phase 1, la quantité d'antigènes de la phase 2 est trop faible pour être détectée. L'inversion de phase consiste à ensemercer la souche dont la phase 1 est connue dans une gélose molle en présence de sérum correspondant à cette phase 1. Seules les bactéries qui ne sont pas immobilisées par ce sérum, donc qui sont de l'autre phase, peuvent migrer dans la gélose molle et être recueillies à distance du point d'ensemencement. Cette population entièrement constituée de bactéries en phase 2 est utilisée pour la détermination de la deuxième phase. Cette technique est connue sous le nom de méthode de Sven-Gard.

C - Antigène Vi

Ce polyside capsulaire n'est trouvé que de façon inconstante chez trois sérotypes : *S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*.

Les souches Vi + qui produisent une quantité importante d'antigène Vi sont O-inagglutinables. Elles deviennent habituellement O-agglutinables après un chauffage à 100°C qui fait passer l'antigène Vi dans le surnageant.

D - Le tableau de Kauffmann-White

Ce tableau indique pour chaque sérovar les antigènes O, Vi et H dont la détermination est utile pour le typage sérologique. A chaque sérovar correspond une formule antigénique. Par exemple, *S. Virchow* : 6,7 : r : 1,2.

Dans ce tableau, les sérovarys qui ont des antigènes O communs caractéristiques sont rassemblés pour former un groupe O désigné par une lettre A, B, C, D etc. Exemple : les sérovarys du groupe B ont tous l'antigène O₄ et ceux du groupe D, l'antigène O₉.

A l'intérieur de chaque groupe O, les sérovarys apparaissent d'après l'ordre alphabétique de la phase 1 de leur antigène H.

TABLEAU H
FORMULES ANTIGÉNIQUES DES SÉROVARS DE *SALMONELLA ENTERICA*
LES PLUS FRÉQUEMMENT RENCONTRÉS EN FRANCE
 (Extrait du tableau de Kauffmann-White)

N	Sérovar	Antigène 0	Antigène H	
			Phase I	Phase II
		Groupe A		
	<i>S. Paratyphi A</i>	1, 2, 12	a	
		Groupe B		
8	<i>S. Paratyphi B</i>	1, 4, (5), 12	b	1,2
	<i>S. Wien</i>	1,4,12,27	b	1,w
	<i>S. Schwarzengrund</i>	1,4, 12,27	d	1,7
	<i>S. Duisburg</i>	1,4, 12,27	d	e, n, z15
10	<i>S. Saint-paul</i>	1,4, 12	e,h	1,2
13	<i>S. Derby</i>	1, 4, (5), 12	f,g	-
	<i>S. Agona</i>	1,4, 12	f,g,s	-
1	<i>S. Typhimurium</i>	1, 4, (5), 12	i	1,2
15	<i>S. Bredeney</i>	1,4,12,22	l,v	1,7
12	<i>S. Brandenburg</i>	1,4, 12	l,v	e, n, z15
11	<i>S. Heidelberg</i>	1,4, (5), 12	r	1,2
	<i>S. Coein</i>	4, 5, 12	y	1.2
		Groupe C1		
	<i>S. Ohio</i>	6,7	b	1,w
	<i>S. Isangi</i>	6,7	d	1,5
14	<i>S. Livingstone</i>	6,7	d	1,w
	<i>S. Braenderup</i>	6,7	e,h	1.2
	<i>S. Montevideo</i>	6,7	g	m,s
	<i>S. Thompson</i>	6,7	k	1,5
5	<i>S. Infantis</i>	6,7	r	1.5
3	<i>S. Virchow</i>	6,7	r	1,2
		Groupe C2		
4	<i>S. Manhattan</i>	6,8	d	1,5
	<i>S. Newport</i>	6,8	e,h	1,2
	<i>S. Litchfield</i>	6,8	l,v	1,2
6	<i>S. Bovismorbificans</i>	6,8	r	1,5
16	<i>S. Hadar</i>	6,8	z10	e,n, x
		Groupe D		
9	<i>S. Panama</i>	1,9, 12	l,v	1,5
7	<i>S. Typhi</i>	9, 12, (Vi)	d	-
2	<i>S. Enteritidis</i>	1,9, 12	g, m	-
8	<i>S. Dublin</i>	1,9,12(Vi)	g,P	-
	<i>S. Gallinarum</i>	1, 9, 12		-
		Groupe E		
	<i>S. Anatum</i>	3, 10	e,h	1,6
	<i>S. Meleagridis</i>	3, 10	e,h	1,w
	<i>S. Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, s,t	-
	<i>S. London</i>	3,10	l,v	1,6
	<i>S. Give</i>	3, 10	l,v	1,7
		Groupe G2		
	<i>S. Tel-el-kebir</i>	13,23	d	e, n, z15
	<i>S. Kedougou</i>	1, 13, 23	i	l, w
	<i>S. Worthington</i>	1, 13,23	z	l, w

Les facteurs entre parenthèses peuvent être absents.

Les chiffres de la colonne N correspondent à l'ordre de fréquence d'isolement des sérotypes les plus fréquents qui représentent 84 % des souches isolées de l'homme en France en 1989 (B.E.H. 1990,16,69).

VII - MARQUEURS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Ils servent à comparer des souches appartenant à un même sérovar pour rechercher l'origine d'une contamination. Plusieurs types de marqueurs sont utilisables.

- **Antibiotypie.** Par simple antibiogramme, une souche possédant de nombreux caractères de résistance peut être distinguée d'une souche sensible.
- **Biotypie.** Elle consiste à comparer certains caractères métaboliques variables au sein d'un même sérotype. Exemple : l'utilisation du d-tartrate par *S. Paratyphi B*, variété Java.
- **Lysotypie.** La souche à tester est soumise à l'action d'une série de bactériophages virulents actifs sur le groupe auquel appartient la souche. La sensibilité aux phages nécessite la présence de récepteurs de surface spécifiques qui sont des caractères génétiques stables pour chaque souche. Le lysotype est la liste des phages lytiques pour la souche étudiée.
- **Bactériocinotypie ou colicinotypie.** Des substances initialement décrites chez *E. coli*, sont produites par certaines souches et sont capables de lyser d'autres souches de la même espèce ou d'espèces voisines. La détection des bactériocines et la détermination du lysotype ne sont effectuées que par des laboratoires spécialisés.

VIII - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE INFECTION A *SALMONELLA*

Il faut toujours chercher à isoler le germe au cours d'une salmonellose. Cela permet sa caractérisation précise pour une enquête épidémiologique et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques. Le sérodiagnostic de Widal et Félix n'est utile que pour les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Le séro-diagnostic n'est qu'une méthode indirecte et des réactions croisées sont possibles même avec des bactéries autres que les *Salmonella*.

MARQUEURS ÉPIDÉMIOLOGIQUES UTILISÉS PAR LE CENTRE DE RÉFÉRENCE POUR LA LYSOTYPIE ET BIOTYPIE ENTÉRIQUE

S. Typhi

Lysotypie :

- système international : 103 lysotypes ;
- lysotypie complémentaire : 10 sous-types.

Action du bactériophage Vi **VII**

Biotypie :

- utilisation du xylose ;
- recherche de la tétrathionate réductase.

Colicinogénie (souche sensible : *E. coli* K 12).

Recherche de l'antigène H : z 55

S. Paratyphi A

Lysotypie, système international : 6 lysotypes.

S. Paratyphi B

Lysotypie, système international : 48 lysotypes.

Biotypie, activité d-tartrate (biovar java).

S. Typhimurium

Lysotypie :

- système international : 265 lysotypes
- lysotypie complémentaire : 21 sous-types.

S. Montevideo

Lysotypie (Vieu et coll.) : 88 lysotypes

Biotypie (Vieu et coli) : 7 biovars.

S. Dublin

Lysotypie (Vieu et coll.) : 57 lysotypes.

Tableau extrait du Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire n° 23/1986

A - Diagnostic direct ; Isolement des *Salmonella*

1. Hémocultures

Elles sont faites de préférence lors des ascensions thermiques. Il est souhaitable que chaque prélèvement recueille environ 10 ml de sang car le nombre de bactéries par ml de sang est souvent faible au cours des fièvres typhoïdes.

La réalisation ne pose pas de problèmes techniques : les *Salmonella* poussent sur milieux usuels. L'hémoculture est surtout utile lors des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Pendant le premier septénaire, elle est positive dans 90 % des cas. Le taux de positivité tombe à 40 % pendant le troisième septénaire.

L'hémoculture peut être positive lors des entérites du jeune enfant. Sa positivité est exceptionnelle dans les entérites de l'adulte et les toxi-infections alimentaires.

2. Coprocultures

a) Indications

- Une coproculture doit être pratiquée dès que l'on suspecte une infection à *Salmonella*.
- Au cours de fièvres typho-paratyphoïdiques, elle reste plus longtemps positive que l'hémoculture.
- Au cours des entérites et des toxi-infections alimentaires, la coproculture est positive alors que les hémocultures restent négatives.
- Après traitement, la coproculture permet de vérifier que le malade ne reste pas porteur sain. L'élimination des *Salmonella* pouvant être intermittente, il y a donc lieu de faire deux coprocultures à une semaine de distance.
- Une coproculture systématique annuelle est préconisée pour les personnes employées dans des cuisines ou dans l'industrie alimentaire.

b) Technique

Au cours des salmonelloses, l'excrétion de germes dans les selles peut être faible.

De plus les *Salmonella* sont en nombre inférieur à des espèces commensales : *Escherichia coli* et *Proteus*. Il faut donc, pour les isoler, utiliser à la fois des milieux d'enrichissement et des milieux sélectifs.

- **A l'arrivée du prélèvement** un milieu d'enrichissement et un milieu sélectif sont ensemencés. Un très grand nombre de milieux ont été proposés. Notamment pour la bactériologie alimentaire. Nous indiquons ici les milieux le plus usuellement adoptés en bactériologie médicale.

Milieux d'enrichissement

Ils permettent à l'aide d'antiseptiques sélectifs inhibant les autres bactéries d'accroître la proportion de *Salmonella*. Un bouillon de Miiller-Kauffmann au tétrathionate ou un bouillon au sélénite de sodium sont ensemencés et repiqués après une incubation de 18 heures à 37°C.

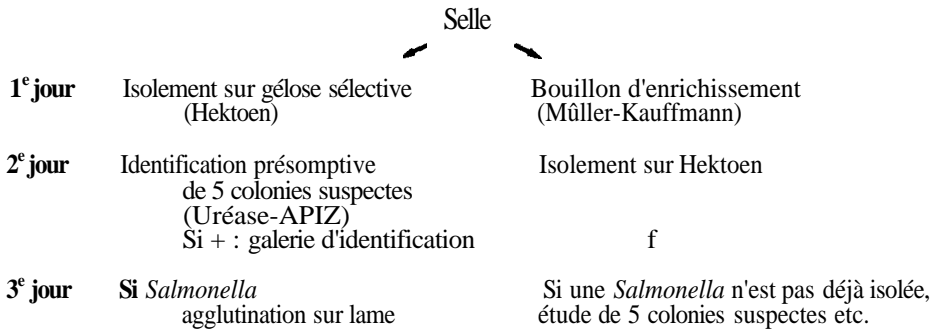
Milieux sélectifs

Ces milieux géloses contiennent des antiseptiques, des sels biliaires qui empêchent la croissance de certaines espèces bactériennes et inhibent l'envahissement par les *Proteus*. Ils permettent de repérer les colonies suspectes par la fermentation de certains sucres (lactose) et la production d' H_2S . La gélose Hektoen est généralement préférée au milieu SS (*Salmonella-Shigella*).

- **Le deuxième jour**, après incubation de ces milieux à 37°C :
 - Le milieu d'enrichissement est repiqué sur un milieu sélectif qui sera examiné le lendemain.

Cinq colonies suspectes (lactose (-) et H₂S (+)) repérées sur le milieu sélectif ensemencé la veille, sont l'objet d'une caractérisation biochimique succincte, puis, si les caractères sont ceux d'une *Salmonella* d'une identification précise et enfin d'un sérotypage.

SCHÉMA D'ISOLEMENT D'UNE *SALMONELLA* PAR COPROCULTURE



3. Autres prélèvements

Dans la bile la recherche de *Salmonella* se fait de façon analogue à la coproculture.

Dans les autres produits pathologiques, urines, pus divers, la présence d'une *Salmonella* est généralement une découverte fortuite du laboratoire.

L'analyse des aliments contaminés en utilisant des milieux sélectifs et des milieux d'enrichissement est la meilleure façon d'isoler une *Salmonella* responsable d'une toxi-infection alimentaire.

B - Diagnostic indirect : le séro-diagnostic de Widal et Félix

Il n'est utile que pour le diagnostic des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes A, B et C et est sans intérêt pour les autres salmonelloses.

Lorsque le malade est vu tardivement ou s'il a bénéficié d'une antibiothérapie appliquée à l'aveugle, l'isolement de la bactérie n'est souvent plus possible. C'est alors que le sérodiagnostic de Widal et Félix a son intérêt. Il permet de rechercher les anticorps anti-O et anti-H dans le sérum. Mais de nombreuses causes d'erreurs existent et l'interprétation est parfois délicate. C'est pourquoi la prescription d'un sérodiagnostic de Widal et Félix doit toujours être accompagnée de celle d'une coproculture voire d'une hémoculture visant à isoler la *Salmonella*.

1. Principe et réalisation

Il s'agit de rechercher dans le sérum des malades les agglutinines correspondant aux antigènes somatiques O et aux antigènes flagellaires H de *Salmonella* Typhi et des *Salmonella* Paratyphi A, B et C.

La recherche d'agglutinines Vi n'a aucun intérêt pratique

Pour cela on utilise des suspensions antigéniques TO, TH, AO, AH, BO, BH, CO et CH. Ces suspensions antigéniques sont constituées de bactéries tuées, traitées soit par l'alcool qui détruit les antigènes H, soit par le formol qui détruit les antigènes O.

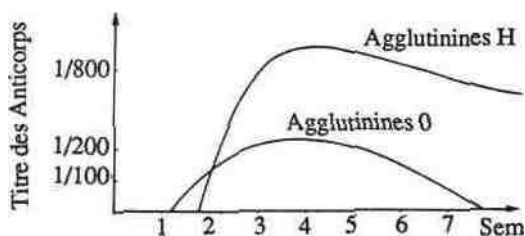
Dans une série de tubes, chaque suspension antigénique est mise en présence de dilutions croissantes du sérum du malade, pour déterminer le titre des agglutinines.

La lecture est faite soit après une centrifugation de 10 minutes (méthode rapide), soit après 2 heures à l'étuve à 37°C.

2. Résultats normaux

Les agglutinines O apparaissent vers le 8^e jour de la maladie, et les agglutinines H vers le 10-12^e jour. A la période d'état, il y a simultanément des agglutinines O et H. Le titre de ces dernières est plus élevé (par exemple TO = 1/200 ; TH = 1/800).

Les agglutinines O disparaissent normalement en 2 à 3 mois. Les agglutinines H persistent plusieurs années après une infection ou une vaccination antityphoparatyphoïdique A et B. La présence seule d'agglutinines O témoigne d'une infection récente.



ÉVOLUTION DU TITRE DES AGGLUTININES
AU COURS DES FIÈVRES TYPHOÏDES ET PARATYPHOÏDES

Une fièvre typhoïde peut parfois s'observer chez un vacciné : dans ce cas, il y a présence simultanée d'agglutinines TH, AH, BH et d'agglutinines O.

Il n'y a pas de relation entre le titre des agglutinines et la gravité de la maladie.

3. Résultats faussement positifs

- La présence d'agglutinines TO seules peut être due à une infection par une *Salmonella* ayant un antigène O commun avec *S. Typhi*, mais des antigènes H différents. Il s'agit le plus souvent de *S. Enteritidis*.
- De même la présence d'agglutinines BO seules peut être due à une infection à *S. Typhimurium*, par exemple.
- Certaines souches de *Yersinia pseudotuberculosis*, à cause de communautés antigéniques, peuvent donner une agglutination avec BO (séro groupe II) ou avec TO (séro groupe IV)
- Des réactions faussement positives peuvent être observées au cours de certaines maladies : paludisme, typhus exanthématique, dysglobulinémies (myélomes, collagénoses, cirrhoses) et infections diverses par des Entérobactéries.

4. Résultats faussement négatifs

- Le sérodiagnostic de Widal est négatif pendant le premier septénaire.
- Un traitement précoce par des antibiotiques ou des corticoïdes peut empêcher l'élévation du taux des anticorps.
- n existe des cas rares de typhoïde authentique sans élévation du taux des anticorps.

IX - TRAITEMENT

Un antibiogramme est effectué sur toute souche de *Salmonella* isolée autant pour caractériser cette souche que pour orienter le traitement antibiotique qui n'est pas systématique pour toutes les salmonelloses digestives.

A - Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes

Les souches isolées en France demeurent généralement bien sensibles aux antibiotiques, contrairement à ce qui a été observé lors d'épidémies au Mexique, au Viet-Nam et au Pérou.

Les antibiotiques de choix sont ceux qui ont une bonne concentration dans les ganglions lymphatiques : chloramphénicol ou triméthoprime-sulfaméthoxazole. L'ampicilline a une concentration lymphatique moins bonne, par contre elle a une bonne élimination biliaire.

Les antibiotiques administrés par voie orale assurent une meilleure concentration lymphatique. C'est le cas des fluoroquinolones.

Contrairement à la règle générale en antibiothérapie, les antibiotiques ont été classiquement donnés à posologie progressive pour éviter une lyse microbienne massive et les inconvénients dus à la libération brutale d'endotoxine.

B - Entérites et toxi-infections alimentaires

Seules les formes sévères chez le nourrisson ou chez le vieillard sont traitées par les antibiotiques. Dans les autres cas où le pronostic est favorable, un traitement symptomatique suffit.

C - Porteurs sains

Les personnes qui, au décours de la maladie, continuent d'éliminer des *Salmonella* dans leurs selles ne doivent pas être traitées par les antibiotiques. Ceux-ci sélectionnent des souches résistantes et sont sans action sur la durée du portage. Seules des mesures d'hygiène sont à préconiser.

X - PRÉVENTION

A - La vaccination

Le vaccin TAB, injectable, constitué de bactéries entières inactivées, mal toléré et conférant une protection de qualité médiocre n'est plus le cauchemar des jeunes incorporés dans l'armée française et des rares catégories de personnes pour lesquelles cette protection est obligatoire.

Deux vaccins ont été mis au point. L'un est un vaccin vivant atténué (souche mutante Ty 21a), utilisable par voie orale. L'autre, disponible en France (TYPHIM Vi®) est un vaccin injectable constitué par le polyside capsulaire de *S. Typhi* ou Ag Vi obtenu purifié sous sa forme 0-acétylée native. Innocuité et efficacité sont les qualités de ce vaccin qui a permis de conférer 72 % et 64 % de protection en milieu à forte incidence (Népal, Afrique du Sud).

B - L'hygiène

Hygiène collective. C'est la prévention du péril fécal par le contrôle bactériologique de l'efficacité du réseau de distribution d'eau potable et l'installation de réseaux d'assainissement.

C'est aussi le contrôle de la qualité bactériologique des denrées alimentaires.

Hygiène individuelle. C'est la détection des porteurs sains notamment parmi le personnel des cuisines ou des industries alimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- HIMMICH H., MARHOUM EL FILAKI K., Antibiothérapie de la fièvre typhoïde. La lettre de l'infectiologue, 1990, 5, 466-468.
- LE MINOR L., POPOFF M., « Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella* », Centre collaborateur OMS de référence et recherche sur *Salmonella*, 1987.
- LE MINOR L., VÉRON M., POPOFF M., « Proposition pour une nomenclature des *Salmonella* », *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1982, **133 B**, 245-254.
- RICHARD C., « Les bactéries qui peuvent être confondues au laboratoire avec les *Salmonella* et les *Shigella* ». *Feuillets de Biologie*, 1981, 22, 37-41.
- VŒU J.F., BINETTE H., LEFEVRE M., LEHERISSEY M., « Épidémiologie de la fièvre typhoïde en France : résistance de *Salmonella typhi* aux antibiotiques (1973-1983) », *Méd. Mal. Infect.*, 1984, **14**, 347-351.
- « Les Nouveaux Vaccins », *Méd. Mal. Infect.*, 1989, **19**, Numéro spécial Novembre.

ANNEXE 1

SÉROTYPAGE D'UNE SOUCHE DE *SALMONELLA*

Ce typage consiste à déterminer par agglutination sur lame les spécificités des antigènes O et H et à reconnaître le sérotype en se référant au Tableau de Kauffmann-White. Le typage est effectué avec des *Salmonella* recueillies sur gélose ordinaire en pente (dont l'humidité permet un bon développement des antigènes H) et non sur milieu sélectif. L'absence d'auto-agglutination de la souche est à vérifier.

Typage simplifié

Environ 98 % des souches de *Salmonella* isolées chez l'homme appartiennent à des sérotypes reconnus par l'utilisation des sérums agglutinants qui suivent :

- sérum anti Vi
- sérums O : 4,5 - 9 - 6,7,8 - 3,10,15.
- sérums H : b - d - i - G - Ll.

Typage par la méthode classique

- Antigènes O

Le premier temps est d'utiliser des sérums polyvalents O appelés OMA, OMB, OMC, etc.

Après agglutination dans l'un de ces sérums on teste les sérums monovalents correspondants pour déterminer le groupe du Tableau de Kauffmann-White auquel appartient la souche.

- Antigènes H

De la même façon on utilise des sérums polyvalents H appelés HMA, HMB, HMC etc. puis des sérums monovalents contenus dans le sérum polyvalent où une agglutination a été observée.

Pour l'inversion de phase par la méthode de Sven Gard, l'un des sérums dénommés SG 1 à 6 contenant les agglutinines correspondant à la phase déjà déterminée est ajouté à la gélose.

IDENTIFICATION PRATIQUE DE *SALMONELLA* TRÈS FRÉQUENTES

1. Détermination du groupe O

Les sérums mélanges sont souvent inutiles. L'utilisation de 3 sérums (04,5 - 06,7,8 - 09) permet de grouper plus de 90 % des *Salmonella* isolées en France.

2. Identification du sérotype Typhimurium 1,4, [5], 12 : i : 1,2

Dans le groupe B (04), le sérotype de loin le plus fréquent est Typhimurium.

- Détermination minimale (en période épidémique comme en ce moment) :

L'agglutination avec un sérum anti-H i est suffisante. En effet, les autres sérotypes ayant **04** et **Hi** (Lagos, Agama, Farsta, Tsevie, Gloucester) sont rarissimes.

- Détermination complète :

Après avoir identifié **Hi**, rechercher une deuxième phase agglutinant avec le mélange **HI** et le sérum monovalent **H2**. Il est souvent nécessaire d'immobiliser les bactéries ayant **Hi** par la méthode de Sven Gard pour faire "courir" celles qui ont **HI,2**.

3. Identification des sérotypes Enteritidis 9,12 : gm : - et Dublin 9,12 : gp : -

Dans le groupe D (09), il est essentiel de distinguer **Enteritidis** de **Dublin** (les manifestations cliniques sont parfois très différentes).

Il est important de savoir que le sérum anti-H gm agglutine les deux sérotypes (g en commun), de même pour le sérum anti-H gp. On ne peut donc pas arrêter le diagnostic à la vue d'une agglutination en gm ou gp.

On peut faire l'économie d'un sérum mélange G (trop de coagglutinations, l'agglutination ne signifie pas qu'il y a un facteur g présent)

Utiliser systématiquement les sérums anti-H **gm**, anti H **m**, et anti-Hp p.

On aura les résultats suivants :

Sérotype	Sérum 09	Sérum gm	Sérum m	Sérum p
Enteritidis	agglutiné	agglutiné	agglutiné	<i>négatif</i>
Dublin	agglutiné	agglutiné	<i>négatif</i>	agglutiné

Sérums à posséder : 0 : 4,5 - 6,7,8 - 9 H : i - gm - m - p
Vi (essentiellement pour ne pas passer à côté d'un Typhi)

ANNEXE 2

EXEMPLES DE RÉSULTATS DE SÉRO-DIAGNOSTICS ET DE LEURS INTERPRÉTATIONS POSSIBLES MAIS NON EXCLUSIVES

(Par le Pr. L. Le Minor, Compte-rendu du contrôle national de qualité en bactériologie)

	1	2	3	4	5	6	7
IO	400	200	200	100	-	400	-
TH	800	-	-	-	400	1600	200
AO	.	.	-	-	-	-	-
AH	-	-	-	-	100	100	-
BO	100	400	-	200	-	-	-
BH	-	800	-	-	200	200	-
00	.	.	.	-	-	-	-
CH	.	-	-	-	-	-	-

- 1) Fièvre typhoïde à la période d'état.
- 2) Fièvre paratyphoïde B à la période d'état : coagglutination TO due aux facteurs 0 communs (12)
- 3) Trois hypothèses au moins à envisager :
 - a) Fièvre typhoïde au début, vers le 8^e jour ; les agglutinines 0 sont apparues, les agglutinines H ne le sont pas encore : un nouveau séro-diagnostic pratiqué quelques jours plus tard pourra les mettre en évidence.
 - b) Infection due à un sérotype de *Salmonella* ayant l'antigène 0 commun avec *S. Typhi*, mais un antigène H différent ; rechercher dans ce cas si la suspension H de *S. Enteritidis* (dans le groupe D, *S. Enteritidis* est un sérotype fréquent) n'est pas agglutinée.
 - c) Infection à *Yersinia pseudotuberculosis* (bacille de Malassez et Vignal), type IV : faire intradermoréaction.
- 4) Trois hypothèses au moins :
 - a) Paratyphoïde B au début avec coagglutination TO. Voir 3a.
 - b) Même raisonnement que 3b. Recherche d'agglutination de 5. Typhimurium H.
 - c) Même raisonnement que 3c avec *Y. pseudotuberculosis* type II

- 5) Vacciné au TAB depuis plus de trois mois : les agglutinines O ont disparu, les agglutinines H persistent pendant de nombreuses années. Les agglutinines AH peuvent être absentes, le vaccin contenant moins de A que de T et B.
- 6) Vacciné au TAB faisant néanmoins une fièvre typhoïde à la suite d'une absorption massive de *S. Typhi* hautement virulentes.
- 7) Trois hypothèses au moins :
 - a) Ancien malade ayant fait une fièvre typhoïde et en ayant gardé la marque sérologique, comme s'il avait reçu un vaccin T seul.
 - b) Infection due à une *Salmonella* possédant l'antigène H : d commun avec *S. Typhi*, mais un antigène O différent de TABC : essayer d'isoler cette bactérie, en particulier par coproculture.
 - c) Fièvre typhoïde traitée précocement par chloramphénicol ou chloramphénicol + corticoïdes. Les agglutinines O peuvent ne pas apparaître. Si un nouveau séro-diagnostic montre une ascension nette des agglutinines TH, si les signes cliniques et hématologiques sont en faveur d'une fièvre typhoïde, cette ascension rend probable ce diagnostic. Mais on ne pourra l'affirmer, la même ascension pouvant s'observer dans l'hypothèse 7b.

ANNEXE 3

RECOMMANDATIONS DU CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES *SALMONELLA* ET DES *SHIGELLA*

I. Chaque isolement de *Salmonella* et de *Shigella* doit être signalé au Centre de Référence.

Son adresse :

Centre National de Référence des *Salmonella* et des *Shigella*

Unité des Entérobactéries

Institut Pasteur de Paris

28, rue du Docteur Roux

75724 PARIS Cedex 15

Tel : (1) 45 68 83 39

II. Plusieurs cas peuvent se présenter.

1) Il s'agit d'une *Salmonella* ubiquitaire.

Elle ne présente pas de caractères anormaux : galerie d'identification typique, antibiogramme sans anomalies, diagnostic sérotypique sans problème.

Il ne s'agit pas d'une *Salmonella* appartenant aux sérotypes Typhi, Paratyphi A ou B. Remplissez les feuilles d'accompagnement fournies par le Centre de Référence, et envoyez-les au Centre de Référence. Il est inutile de joindre la souche.

2) Il s'agit d'une *Salmonella* appartenant aux sérotypes Typhi, Paratyphi A ou B.

La feuille d'accompagnement sera soigneusement remplie. Elle sera adressée avec la souche au Centre de Référence pour étude lysotypique.

3) Il s'agit d'une *Salmonella* dont on ne peut mener à bien la sérotypie.

Remplir soigneusement la fiche d'accompagnement en signalant les agglutinations observées. Adresser la souche au Centre de Référence.

Les identifications des sérotypes de *Salmonella* (d'origine humaine) sont effectuées gratuitement à condition qu'une étude minimale ait été faite (agglutinations recherchées avec les sérums 0:4,5 - 0:9 - 0:6,7,8).

4) Il s'agit d'une toxi-infection alimentaire collective ou d'une épidémie de crèche. Remplir soigneusement la feuille de renseignements.

Éventuellement, la compléter sur une fiche manuscrite avec les notions d'intérêt épidémiologique que vous avez obtenues.

Ne pas omettre d'indiquer le nombre de cas observés.

Adresser la souche au Centre de Référence.

Si l'épidémie continue : après l'envoi initial, adresser régulièrement des feuilles de renseignements, en précisant « Continuation de l'épidémie - Pour information ».

Si les modifications apparaissent dans le comportement des souches, au moindre doute, adresser les souches qui semblent anormales, au Centre de Référence.

5) Il s'agit d'une *Shigella*.

Vérifier l'absence de mobilité, la négativité de la LDC et du citrate de Christensen (diagnostic différentiel avec *Aikalescens-dispar*).

S'il s'agit d'un cas isolé de *Shigella sonnei*, sans problème diagnostique, remplir une feuille et l'adresser SEULE, sans la souche, au Centre National : « Pour information, souche non adressée ».

S'il s'agit d'une épidémie à *Sh. sonnei*, adresser toutes les souches pour biotypie et lysotypie, avec une lettre d'accompagnement donnant toutes informations utiles.

S'il s'agit de *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, il faut adresser la souche pour identification sérotypique précise.

III. Remarques

1. Comment acheminer vos cultures.

Pas de boîtes de Pétri.

Pas de bouillon.

Seuls des milieux solides conviennent : gélose ordinaire inclinée en tube bouché à vis. Ou mieux un tube de milieu pour conservation des souches bactériennes. (Pasteur-Diagnostics, tube de 95 x 8). Envelopper le tube dont le bouchon est bloqué, dans du papier absorbant. Introduire l'ensemble dans un étui métallique, lui-même placé dans un second emballage en bois ou en plastique (Bulletin Officiel des P.T.T.)

2. Les données épidémiologiques sont stockées dans la banque de données, et utilisées à des fins d'information épidémiologique et de prophylaxie.

Il est important de remplir le plus complètement possible la fiche d'accompagnement, en mentionnant chaque fois l'origine géographique de la contamination. Exemples :

- Malade revenant de Calcutta, hospitalisé à Pont-l'Abbé.
- Malade habitant Le Touquet, hospitalisé à Arras.
- Souche isolée à Paris, de cuisses de grenouilles importées du Pakistan.
- Eau usée prélevée à Saumur et analysée à Angers.

3. Pour obtenir des nouvelles feuilles. Indiquer **en rouge sur une feuille** : « Adressez X nouvelles feuilles SVP ».

4. Si nécessaire, en cas de besoin urgent d'informations ou de renseignements, téléphoner à : **Centre National de Référence. Tel ; (1) 45 68 83 39**

ANNEXE 4

NOTE SUR *CITROBACTER*

I - DÉFINITION

Ce genre rassemble trois espèces *d'Enterobacteriaceae* qui ont les caractères suivants : citrate (+), fermentation du glucose avec gaz, mobilité (+), test ONPG (+), réaction de VP négative et absence de LDC.

Il existe de nombreuses souches atypiques de *Citrobacter*. Celles qui sont ONPG négatif et produisent de l' H_2S peuvent être confondues avec les *Salmonella*. Certaines souches peuvent être H_2S négatif, ou citrate de Simmons négatif, ou agazogènes. Se reporter au tableau qui donne les caractères permettant de distinguer les deux genres.

II - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

Les *Citrobacter* sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. Ils sont trouvés dans l'environnement et dans les eaux. Ils peuvent être isolés occasionnellement d'urines ou de suppurations diverses.

III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

L'espèce type, *C.freundii*, se développe sur milieu usuel en donnant une odeur nauséabonde. La production d' H_2S et l'absence de production d'indole permettent de faire la distinction avec *C. diversus* et *C. amalonaticus*. Le tableau ci-dessous donne les caractères différentiels entre les trois espèces.

	<i>C.freundii</i>	<i>C. diversus</i>	<i>C. amalonaticus</i>
Production d' H_2S	+		
Production d'indole		+	+
Croissance en KCN	+		+
Utilisation du malonate		+	

Chapitre XIV

KLEBSIELLA - ENTEROBACTER

SERRATIA

Dans le groupe *Klebsiella - Enterobacter - Serratia*, dit K.E.S., sont rassemblées des *Enterobacteriaceae* qui ont en commun les caractères suivants :

1/ La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive. Cette réaction consiste à mettre en évidence la production d'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne) par la bactérie. Elle est très spécifique. Un VP positif signifie que la souche possède une voie métabolique particulière pour la fermentation des hexoses, la voie butylèneglycolique.

2/ Ce sont des Bactéries Pathogènes Opportunistes.

Peu virulentes par elles-mêmes, elles se rencontrent peu en pratique extra-hospitalière. Opportunistes, elles sont responsables d'infections hospitalières nosocomiales chez des malades débilisés : cirrhotiques, diabétiques, brûlés, cancéreux, vieillards, malades de réanimation, nourrissons.

3/ **Ces espèces sont souvent multirésistantes aux antibiotiques.** La fréquence avec laquelle on les rencontre est d'autant plus grande que la pression de sélection par des antibiotiques à large spectre est forte.

Les caractères bactériologiques qui permettent de distinguer les genres formant le groupe K.E.S. sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I
PRINCIPAUX CARACTÈRES DISTINCTIFS ENTRE LES GENRES *KLEBSIELLA*,
ENTEROBACTER, *SERRATIA* ET *HAFNIA*

	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Hafnia</i>
Mobilité		+	+	+ à 22°C
ODC	-	+	(+)	+
ADH		d		
DNase			+	
Gélatinase			+	

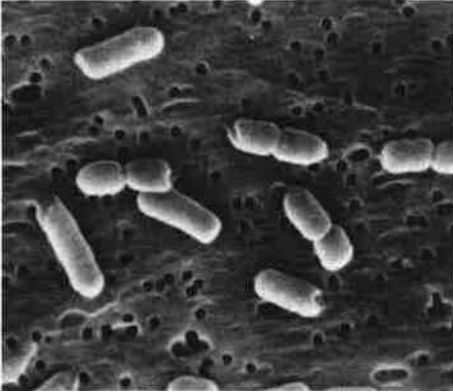
()= exceptions ; d = caractère variable.

GENRE KLEBSIELLA

1 - DÉFINITION ET CLASSIFICATION

Les *Klebsiella* sont des *Enterobacteriaceae* toujours immobiles, possédant généralement une capsule et fermentant de nombreux glucides. Elles ne possèdent ni ODC, ni ADH, ni tryptophane-désaminase (TDA), ni lipase et ne produisent pas d' H_2S .

La classification des différentes espèces de *Klebsiella* est discutée.



Néanmoins 6 espèces sont usuellement reconnues :

- Quatre espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme :
K. pneumoniae (espèce-type),
K. oxytoca, *K. ozaenae*
 et *K. rhinoscleromatis*.

Deux espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes, ce sont *K. terrigena* et *K. planticola* qui ne seront pas décrites ici.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

K. pneumoniae et *K. oxytoca* sont les espèces les plus souvent rencontrées. Elles sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires.

Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches, soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

K. pneumoniae, de loin la plus souvent rencontrée, et *K. oxytoca* sont isolées principalement de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépato-biliaires ou de pus divers.

En raison du terrain débilité sur lequel elles se développent, les septicémies à *Klebsiella* ont un pronostic très sévère.

K. ozaenae n'est pratiquement isolée que d'infections respiratoires chroniques. Elle est rarement isolée d'urines ou d'hémocultures. Il en est de même de *K. rhinoscleromatis* qui est rarement rencontrée en France. Elle est plus fréquente en Afrique.

Le rôle de *K. ozaenae* comme agent étiologique de l'ozène et celui de *K. rhinoscleromatis* comme agent du rhinosclérome sont imparfaitement établis.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Aspect des colonies

Sur milieux usuels, les *Klebsiella* donnent après une incubation de 24 heures à 37°C des colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses et ayant une tendance à la confluence.

Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse, est parfois observée avec d'autres *Enterobacteriaceae* notamment certaines souches de *E. coll.*

B - Diagnostic d'espèce

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

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

TABLEAU H
PRINCIPAUX CARACTÈRES PERMETTANT LE DIAGNOSTIC DES ESPÈCES DU GENRE
KLEBSIELLA

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
Voges-Proskauer	+	+		
ONPG	+	+	+	
LDC	+	+	d	
Indole		+		
Malonate	+	+		
Uréase	(+)	+	d	

() = exceptions ; d = caractère variable

C - Diagnostic différentiel

La majorité des souches de *K. pneumoniae* est uréase (+) en milieu « urée-indole ». Les souches uréase (-) de *K. pneumoniae* sont parfois confondues avec *Enterobacter aerogenes* qui s'en distingue par la mobilité et l'ODC, (tableau III).

TABLEAU m
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DE *K. PNEUMONIAE* ET DE *E. AEROGENES*

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>
Mobilité		+
ODC		+
Carbénicilline	R	S
Uréase	(+)	

R : résistant ; S = sensible

D - Marqueurs épidémiologiques

Leur recherche est faite par des laboratoires spécialisés pour écarter ou affirmer l'existence d'infections nosocomiales épidémiques en milieu hospitalier.

- Le typage capsulaire. C'est la méthode la plus discriminante. Il existe 77 antigènes capsulaires K. La détermination de ces antigènes se fait essentiellement

par la réaction de gonflement de la capsule ou réaction de Neufeld, en présence de l'immun-sérum correspondant.

La biotypie. Elle est moins performante. Huit biotypes peuvent être distingués par l'étude de 3 caractères : sorbose, dulcitol et d-tartrate.

V - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Klebsiella* ont une résistance naturelle à l'ampicilline et la carbénicilline. Elles sont normalement sensibles aux céphalosporines. Des enzymes récemment caractérisées, CTX-1 (TEM 3, *K. pneumoniae*) et SHV-2, rendent les souches résistantes aux uréidopénicillines, à toutes les céphalosporines (excepté les céphamycines) et aux monobactames. Ces nouvelles bêta-lactamases plasmidiques sont fortement inhibées par l'acide clavulanique. Chez *K. oxytoca*, la bêta-lactamase à spectre élargi a un support chromosomique, elle est inhibée par l'acide clavulanique.

La majorité des souches héberge des plasmides R qui les rendent résistantes à de nombreux antibiotiques. Le traitement ne peut se passer d'un antibiogramme sur lequel il est nécessaire de tester les antibiotiques les plus récents.

GENRE ENTEROBACTER

1 - DÉFINITION ET CLASSIFICATION

Les *Enterobacter* sont des *Enterobacteriaceae* VP (+), voisines des *Klebsiella* dont elles se distinguent par leur mobilité, par la présence d'une ODC, parfois d'une ADH et par l'absence d'uréase. La TDA, la DNase, la production d'indole et d'H₂S sont négatives.

La classification des *Enterobacter* a été l'objet de nombreux remaniements. Nous indiquons dans le tableau ci-dessous les dénominations des espèces rencontrées en bactériologie médicale.

Dénomination actuelle	Dénomination ancienne
<i>E. cloacae</i>	<i>Aerobacter cloacae</i> , <i>Cloaca A</i>
<i>E. aerogenes</i>	<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>Cloaca B</i>
<i>E. agglomérons</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
<i>E. gergoviae</i>	<i>Enterobacter</i> uréase (+)
<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i> pigmenté en jaune
<i>E. asburiae</i>	
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter hafniae</i>

L'espèce type est *E. cloacae*. C'est aussi la plus souvent rencontrée.

L'espèce *Hafnia alvei* est aujourd'hui classée dans le genre *Hafnia* dont elle est le seul représentant.

Les *Erwinia* sont des *Enterobacteriaceae* phytopathogènes non rencontrées en bactériologie médicale.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Enterobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. On les trouve dans les eaux, sur le sol, sur la peau et les muqueuses. Ce sont des bactéries de l'hospitalisme.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

Ces bactéries pathogènes opportunistes peuvent être responsables de septicémies, de méningites, d'infections urinaires, d'infections néonatales et de suppurations diverses.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Les caractères biochimiques qui permettent de distinguer les espèces rencontrées en clinique sont indiqués dans le tableau IV.

Il est à noter que les colonies de *E. sakazakii* sont pigmentées en jaune. Un pigment jaune peut aussi être produit par des souches de *E. agglomerans*. Cette dernière espèce est hétérogène et constituée de plusieurs biotypes.

E. gergoviae possède une uréase.

E. asburiae est immobile, RM (+), malonate (-), rhamnose (-).

TABLEAU IV
CARACTÈRE DES DIFFÉRENTES ESPÈCES D'ENTEROBACTER

	<i>E. cloacae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. agglomerans</i>	<i>E. gergoviae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. asburiae</i>
ADH	+				+	
LDC		+		+		
ODC	+	+		+	+	+
Sorbitol	+	+	<i>d</i>			+
Uréase				+		
Pigmentjaune			<i>d</i>		+	

V - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Enterobacter* sont souvent très résistants aux antibiotiques. *E. cloacae* a une résistance naturelle à l'ampicilline et à la céphalotine. Un pourcentage important des souches est résistant à la carbénicilline, à la gentamicine, aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux sulfamides et au triméthoprim. La sensibilité aux ureido-pénicillines, aux céphalosporines de 3^e génération, aux aminosides et aux quinolones doit être déterminée par antibiogramme.

Certaines souches de *E. cloacae* initialement sensibles au céfotaxime peuvent devenir résistantes aux céphalosporines de troisième génération au cours d'un traitement par une de ces céphalosporines. Il s'agit soit de l'induction d'une céphalosporinase chromosomique, soit de la sélection d'un mutant déréprimé produisant à haut niveau cette céphalosporinase.

L'enzyme en cause est une bêta-lactamase de la classe 1 de Richmond et Sykes. Elle inactive les molécules récentes à l'exception de l'imipénème. Elle n'est pas inhibée par l'acide clavulanique. L'induction peut être détectée sur antibiogramme en plaçant un disque de céfoxitine, très inductrice, à côté d'un disque de céfotaxime.

Ce mécanisme de résistance, fréquent chez *E. cloacae*, peut aussi être rencontré chez les principales espèces de *Enterobacteriaceae* sauf *E. coli* et *Shigella* et chez *Pseudomonasaeruginosa*.

GENRE SERRATIA

I - DÉFINITION ET CLASSIFICATION

Les *Serratia* sont des *Enterobacteriaceae* généralement mobiles. Elles donnent parfois des colonies pigmentées en rouge. Elles sont VP (+), ONPG (+) et produisent de nombreux enzymes extracellulaires. Elles ne possèdent pas d'ADH, ni de TDA, ni d'uréase et ne produisent pas d'H₂S.

Huit espèces sont actuellement reconnues :

S. marcescens, *S. liquefaciens* (antérieurement classée comme *Enterobacter*), *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. odorifera* et *S. ficaria*, *S. fonticola* et *S. entomophila*.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Serratia* sont des bactéries de l'environnement trouvées sur le sol et sur les plantes. *S. marcescens* est une espèce ubiquitaire qui est la seule à jouer un rôle important comme pathogène opportuniste. Les souches pigmentées sont répandues dans la nature, mais rarement isolées en milieu hospitalier ; les souches non pigmentées sont fréquemment isolées en milieu hospitalier. Elles sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques.

Les *Serratia* sont les Entérobactéries les plus résistantes aux agents physiques et chimiques. Elles peuvent survivre des mois dans l'eau distillée et se multiplier dans des solutions antiseptiques : ammoniums quaternaires, chlorhexidine. Elles se multiplient bien à +4°C. Elles sont tuées par la chaleur ou l'eau de Javel. Les infections hospitalières peuvent être en relation avec des antiseptiques ou des flacons contaminés, mais la transmission manuportée semble la plus fréquente.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

Les *Serratia* sont peu pathogènes pour les sujets sains. Aujourd'hui, elles sont responsables d'infections hospitalières parfois épidémiques, particulièrement *S. marcescens*. La localisation de l'infection dépend de la nature de l'activité du service hospitalier : infections urinaires après manoeuvres instrumentales ; infections respiratoires dues à l'emploi d'appareils de ventilation artificielle ou par aérosols ; surinfections des plaies par des antiseptiques contaminés ; septicémies compliquant les infections précédentes ou consécutives à l'usage de cathéters.

En dehors des infections acquises à l'hôpital, des infections graves à *Serratia* (endocardites, ostéomyélites) ont été observées chez les héroïnomanes. *S. plymuthica* et *S. ficaria* n'ont pas de pouvoir pathogène connu pour l'homme.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Certaines souches de *S. marcescens*, isolées plus souvent de l'environnement que chez l'homme, produisent un pigment rouge, la prodigiosine. La majorité des souches de *S. marinorubra* et de *S. plymuthica* produit un pigment rosé ou rouge.

La plupart des souches de *Serratia* donne sur antibiogramme une zone d'inhibition autour de la colistine avec une repousse « en cocarde » autour du disque. Cet aspect peut parfois s'observer avec d'autres espèces bactériennes.

Les caractères distinctifs des différentes espèces de *Serratia* sont indiqués dans le tableau V. A noter que :

S. marcescens est raffinose (-) et arabinose (-),

S. liquefaciens est adonitol (-), arabinose (+),

S. rubidaea est ODC (-) et sorbitol (-),

S. odorifera produit de l'indole.

TABLEAU V
CARACTÈRES DISTINCTIFS DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *SERRATIA*

	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. rubidaea</i>	<i>S. odorifera</i>
Pigment	d		d	+	d
ODC	+	+			
Adonitol	+			+	+
Raffinose		+	+	+	d
Arabinose		+	+	+	+
Sorbitol	+	+	d		+
Indole					+

Pour des études épidémiologiques, il est possible de caractériser les souches de *S. marcescens* par biotypie ou par sérotypie.

V - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Serratia* sont parmi les espèces bactériennes les plus résistantes aux antibiotiques. Elles ont une résistance naturelle à la céphalotine, à la colistine et aux tétracyclines. Certaines souches sont résistantes aux céphalosporines de 3^e génération soit par production d'une céphalosporinase, soit par diminution de la perméabilité. Parmi les *Serratia*, des souches pratiquement « résistantes à tout » peuvent se rencontrer. Elles posent des problèmes thérapeutiques difficiles.

GENRE HAFNIA

Ce genre est formé d'une seule espèce, *Hafnia alvei*, antérieurement désignée comme *Enterobacter alvei*.

Hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux, *H. alvei* peut être isolée lors d'infections opportunistes.

Les caractères biochimiques de *H. alvei*, notamment le VP, sont plus régulièrement positifs après une incubation à 22°C qu'à 37°C. *H. alvei* est mobile à

22°C et souvent immobile à 37°C. Les réactions suivantes sont positives : LDC, ODC, ONPG (exceptions), arabinose, mannitol. *H. alvei* est parfois confondue avec des *Salmonella* H₂S négatives.

BIBLIOGRAPHIE

- GRIMONT, P.A.D., « Thé genus *Serratia* », *Ann. Rev. Microbiol.*, 1978, 32, 221-248.
- PECHÈRE J.-C., La résistance à *Enterobacter cloacae* acquise au cours des traitements par les nouvelles bêta-lactamines, *Med. Mal. Infect.*, 1986, **16**, 661-665.
- RICHARD C., ALONSO J.M., « Une Entérobactérie méconnue : *Enterobacter hafniae* », *Bull. Inst. Pasteur*, 1976, 74, 339 à 352.
- RICHARD C., « Bactériologie et épidémiologie des espèces du genre *Klebsiella* », *Bull. Inst. Pasteur*, 1982, **80**, 127-145.
- RICHARD C., GRIMONT P.A.D., « *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* » in *Bactériologie médicale*, Le Minor et Véron, Flammarion, Paris, 1990.

Chapitre XV

PROTEUS - PROVIDENCIA MORGANELLA

I - DÉFINITION

Ce groupe d'*Enterobacteriaceae* rassemble des espèces qui ont en commun de posséder des enzymes permettant la **désamination oxydative** des acides aminés en corps cétoniques. Ceux-ci forment des complexes colorés avec les ions Fe^{+++} .

Deux de ces enzymes sont recherchées en pratique courante. Ce sont :

- la tryptophane-désaminase ou TDA,
- la phénylalanine-désaminase ou PDA.

Dans la suite de ce chapitre, ce groupe de bactéries sera désigné comme « Entérobactéries TDA+ ». C'est un groupe très hétérogène . Ces bactéries sont en général mobiles, donnent des colonies lactose négatif et sont ONPG négatif.

II - CLASSIFICATION

Les travaux de taxonomie basés sur les réactions d'hybridation du DNA ont montré que :

- Les souches antérieurement désignées comme *Proteus morganii* n'appartiennent pas au genre *Proteus*. Elles forment le genre *Morganella*.
- Les souches désignées comme *Proteus rettgeri* doivent être classées dans le genre *Providencia*.

La classification actuelle du groupe des Entérobactéries TDA+ est la suivante :

- genre *Proteus*, 4 espèces : *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri* et *P. myxofaciens*. Cette dernière n'a pas d'intérêt médical.
- genre *Providencia*, 4 espèces : *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, ***P. rettgeri*** et *P. rustigianii* (proche de *P. alcalifaciens*)
- genre *Morganella*, une seule espèce : *M. morganii*

III - HABITAT

Les Entérobactéries TDA+ sont extrêmement répandues dans l'environnement. On les trouve partout, sur le sol, dans les eaux de surface, dans les eaux d'égout etc. Ce sont des hôtes habituels du tube digestif de l'homme et des animaux.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

Ces bactéries sont avant tout responsables d'infections urinaires. *P. mirabilis* est de loin l'espèce la plus fréquente. Les espèces rencontrées ensuite sont *M. morganii* et les *Providencia*. Une anomalie de l'appareil urinaire ou un diabète sont des circonstances favorisant la survenue de ces infections qui peuvent être à l'origine de septicémies.

Ces bactéries sont aussi isolées de produits pathologiques variés : sécrétions trachéo-bronchiques, brûlures, pus divers. Des méningites à *Proteus* ont été décrites chez le nourrisson.

Le pouvoir entéropathogène des *Proteus* et des *Providencia* est très discutable. Ces espèces sont souvent présentes en grande quantité dans les selles lors des diarrhées par dysmicrobisme intestinal.

En raison de la grande fréquence des Entérobactéries TDA+ dans l'environnement, il y a toujours lieu de s'interroger sur la qualité des prélèvements avant d'attribuer un rôle pathogène aux souches isolées.

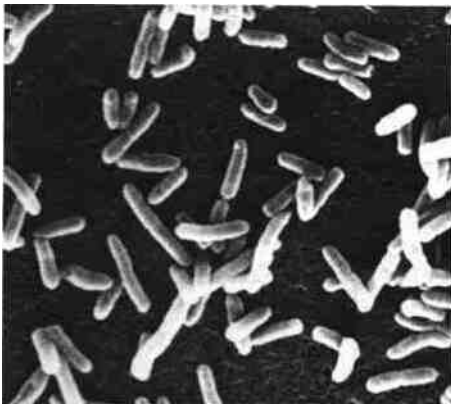
V - PHYSIOPATHOLOGIE

Plusieurs facteurs contribuent à ce que les Entérobactéries TDA+ du groupe *Proteus* -*Providencia* soient uropathogènes.

- L'uréase que possèdent la plupart des souches transforme l'urée en hydroxyde d'ammonium. Il s'en suit une élévation du pH de l'urine, ce qui altère les cellules rénales et favorise la formation de calculs.
- *P. mirabilis* possède des pili qui en augmentant leur adhérence aux cellules épithéliales favorisent la survenue d'une pyélonéphrite ascendante.
- La grande mobilité des *Proteus* favorise leur diffusion dans l'appareil urinaire. Des travaux expérimentaux ont montré que des souches mises en contact avec des anticorps antiflagelles perdaient leur aptitude à provoquer une infection ascendante.

VI - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie



P. mirabilis et *P. vulgaris* sont des bacilles très polymorphes (d'où la référence à Protée). Dans une culture jeune, il peut exister des formes courtes et des formes longues. Les souches très mobiles sont pourvues de longs flagelles.

B - Caractères cultureux

- En bouillon, les cultures se développent en donnant souvent un voile en surface.
- En milieu gélose, *P. mirabilis* et *P. vulgaris* peuvent envahir la surface du milieu en formant des ondes concentriques. Cet essaimage, ou swarming, est dû à la grande mobilité de la bactérie. L'envahissement des cultures par les *Proteus* peut être réduit par la présence dans le milieu de sels biliaires ou de détergents, par accroissement de la teneur en gélose ou par une diminution de la teneur en NaCl (milieu CLED = Cysteine Lactose Electrolyte Déficiant).
- Phénomène de *Dienes*
Les cultures en nappe par essaimage de deux souches différentes de *Proteus* ne s'interpénètrent pas et sont séparées par une zone étroite sans culture. Ce phénomène peut être utilisé pour comparer des souches isolées d'un même secteur hospitalier.

C - Caractères biochimiques

1. Genre *Proteus*

Les *Proteus* sont caractérisés par leur uréase très active (exceptions), la production d' H_2S , d'une gélatinase et leur pouvoir glucidolytique faible.

- *P. mirabilis* est indole (-) et ODC (+)
- *P. vulgaris* est indole (+) et ODC (-)
- *P. penneri* est indole (-) et ODC (-), H_2S (d) toujours résistant au chloramphénicol

TABLEAU
DIAGNOSTIC D'ESPÈCES DES *PROTEUS*, *PROVIDENCIA* ET *MORGANELLA*

	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. rustigianii</i>	<i>M. morganii</i>
Essaimage	+	+	+	-	-	-	-	-
Production d' H_2S	+	+	d	-	-	-	-	-
Uréase	+	+	+	-	+	d	-	+
Indole	-	+	-	+	+	+	+	+
ODC	+	-	-	-	-	-	-	+
Mannose	-	-	-	+	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	+	+	-	-	-

2. Genre *Providencia*

Ces souches produisent de l'indole, mais pas d' H_2S , de LDC, d'ODC, ni d'ADH.

- *P. alcalifaciens* est uréase (-), adonitol (+), et tréhalose (-) ;
- *P. rettgeri* est uréase (+), adonitol (+) et tréhalose (-) ;
- *P. stuartii* est uréase variable, adonitol (-) et tréhalose (+) ;
- *P. rustigianii* est uréase (-), adonitol (-) et tréhalose (-).

3. Genre *Morganella*

M. morganii est indole (+), ODC (+), uréase (+) et H_2S (-). Cette espèce a une très faible activité glucidolytique.

VII - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les Entérobactéries TDA+ ont une résistance naturelle à la colistine et à la tétracycline.

Il est classique d'opposer les « *Proteus* indole (-) » (généralement plus sensibles aux antibiotiques, notamment les bêta-lactamines) aux « *Proteus* indole (+) » souvent multirésistants. *P. stuartii* et *M. morganii* peuvent poser des problèmes difficiles d'antibiothérapie. Ils restent néanmoins généralement sensibles à l'amikacine et aux céphalosporines de 3^e génération. A l'exception des souches de *Providencia*, les Entérobactéries TDA+ sont habituellement sensibles aux nouvelles fluoroquinolones.

BIBLIOGRAPHIE

WARREN J.W., « *Providencia stuartii* : a common cause of antibiotic-resistant bacteriuria in patients with long-term indwelling catheters », *Rev. Infect. Dis.*, 1986, 8, 61-67.

Chapitre XVI

YERSINIA

HISTORIQUE

Le genre *Yersinia*, du nom du bactériologiste Alexandre Yersin qui le premier a isolé en 1894 le bacille de la peste, a été proposé en 1944 et officialisé en 1974 après le démantèlement du genre *Pastewella*.

En 1883, Malassez et Vignal ont isolé *Pasteurella pseudotuberculosis* chez des cobayes présentant des lésions pseudo-tuberculeuses du foie, de la rate, et des ganglions ; cette bactérie était responsable d'épizooties en particulier chez les rongeurs et le rôle de *Y. pseudotuberculosis* en pathologie humaine a été montré à partir de 1954.

Dans les années 1960, *Y. enterocolitica* a été responsable d'épizooties atteignant des élevages de chinchillas en Europe Occidentale et est depuis cette date isolée dans un nombre croissant de cas humains. Actuellement, le bacille de la peste n'occupe plus la place qui fut la sienne pendant des siècles et le devant de la scène est occupé de façon nettement moins spectaculaire par *Y. enterocolitica*.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU GENRE

Le genre *Yersinia* regroupe des bacilles droits, parfois cocco-bacillaires, à Gram négatif, avec une tendance à la coloration bipolaire, de 0,5-0,8 (-un x 1-3 u.m, non capsulés, non sporulés, immobiles à 37°C, mobiles au-dessous de 30°C par une ciliature péritriche. Cependant *Y. pestis* est toujours immobile.

Les *Yersinia* présentent les caractères généraux des *Enterobacteriaceae* auquel le genre appartient avec cependant des particularités comme l'expression de caractères phénotypiques dépendant de la température.

II - TAXONOMIE ET NOMENCLATURE

Le genre *Yersinia* est constitué de plusieurs espèces qui peuvent être séparées en deux groupes : d'une part les espèces virulentes *Y. pestis* (bacille de Yersin), *Y. pseudotuberculosis* (bacille de Malassez et Vignal) et *Y. enterocolitica* (sérogroupes 0:3, 0:8, 0:9 et 0:5,7) ; et d'autre part les espèces non virulentes pour l'homme : *Y. enterocolitica* des autres sérogroupes, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. aldovae*, *Y. ruckeri*, pathogène pour les poissons, n'appartiendrait pas au genre *Yersinia*. Deux nouvelles espèces, *Y. mollaretii* et *Y. bercovieri* ont été récemment décrites. *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont deux espèces très proches sur le plan génétique (homologie d'hybridation ADN-ADN très élevée) et pourraient être deux variants pathogènes d'une même espèce.

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les bactéries du genre *Yersinia* ont une vaste distribution et peuvent être isolées dans le sol et chez de nombreuses espèces animales. Les espèces pathogènes atteignent diverses espèces animales et occasionnellement l'homme.

A - Le bacille de la peste

Y. pestis, est présent essentiellement chez les rongeurs. Des dizaines d'espèces présentes sur tous les continents peuvent être infectées. La dispersion de la maladie est assurée par le couple rongeur-puce et l'épidémiologie de la peste est étroitement liée à **l'écologie des rongeurs et de leurs puces**. La bactérie survit plusieurs mois dans le sol, et les terriers contaminés par les cadavres de rongeurs et de puces constituent le réservoir de bactéries. Lorsque la maladie animale atteint les rongeurs des villes, en particulier les rats, la contamination de l'homme devient possible par l'intermédiaire de la piqûre de puce. La peste a disparu d'Europe au début du siècle mais elle est encore observée en Afrique (Centrale, de l'Est, du Sud), en Asie (du Sud-Est, en U.R.S.S., en Iran), et en Amérique du Nord et du Sud, sous forme enzootique.

Les souches de *Y. pestis* présentent des caractéristiques biochimiques particulières en fonction de leur distribution géographique : le biovar *antiqua* est observé en Asie Centrale et en Afrique Centrale ; le biovar *medievalis* est rencontré en Iran et en U.R.S.S. ; le biovar *orientalis* (ou *oceanic*) a une distribution mondiale.

B - *Y. pseudotuberculosis*

Cette espèce a comme réservoir le sol et les animaux contaminés à partir du sol comme les rongeurs et les oiseaux. D'autres espèces animales peuvent être concernées. La maladie chez l'homme est observée au cours de la saison froide après contact direct avec les animaux porteurs qui éliminent *Y. pseudotuberculosis* dans les fèces. Des animaux proches de l'homme comme le chat (chasseur de rongeurs et d'oiseaux) et des petits rongeurs « de loisirs » entretenus à la maison jouent un rôle non négligeable. La maladie est aussi observée au printemps après contamination à partir du sol ou d'aliments ou de végétaux contaminés par les excréments de micromammifères ou d'oiseaux. Ceci fait de l'infection par *Y. pseudotuberculosis* une **saprozoonose pseudotellurique**, maladie commune à l'animal et à l'homme avec un réservoir commun constitué par le milieu extérieur.

C - *y. enterocolitica*

Cette espèce possède une distribution et un réservoir beaucoup plus vastes. De plus l'hétérogénéité qui sera décrite sur le plan biochimique existe également au point de vue épidémiologique. *Y. enterocolitica* a été isolé chez des rongeurs, des micromammifères, chez le porc, dans les eaux, le sol, les aliments. Il existe des souches adaptées à un environnement ou à un hôte (homme ou animal) et des souches non adaptées rencontrées dans le sol, l'eau, le tube digestif des micromammifères. *Y. enterocolitica* est pathogène pour les chinchillas, les lièvres, les singes et l'homme. Les souches de biovar 5 sont rencontrées chez le lièvre en Europe, celle de biovar 3 chez le chinchilla. Les souches de biovar 4, séro groupe 0:3, de biovar 3, séro groupe 0:5 et de biovar 2 séro groupe 0:9 sont les plus fréquentes chez l'homme en Europe ; celles de séro groupe 0:8 sont plus fréquemment isolées au U.S.A.

La maladie humaine est surtout observée depuis 1960 et l'augmentation de la prévalence des infections à *Y. enterocolitica* chez l'homme peut être attribuée d'une part à la particularité de l'espèce de se multiplier à basse température et d'autre part à

la présence fréquente de *Y. enterocolitica* dans certains aliments (végétaux, viandes et charcuteries, lait et dérivés). Ceci est en relation avec l'importance prise par la chaîne du froid pour la conservation des denrées alimentaires en milieu familial, avec des changements d'attitudes alimentaires et la consommation de nombreux végétaux crus, avec la généralisation de la restauration collective qui amplifie les deux éléments précédents.

La contamination se fait donc essentiellement par voie digestive ; exceptionnellement les voies sous-cutanée, oculaire, et après griffure de chat ont été observées.

Les espèces *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, et *Y. frederiksenii* présentes dans le milieu extérieur (dans l'eau, le sol) et occasionnellement isolées chez l'homme sont considérées comme non pathogènes.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

A - *Y. pestis*

C'est l'agent de la peste, maladie avant tout des rongeurs sauvages transmise d'animal à animal par la puce. Chez cette dernière la bactérie se multiplie et engorge l'oesophage et le pharynx ; la contamination se fait lors du repas au cours duquel la puce régurgite les bactéries.

L'homme est un hôte accidentel choisi par *Xenopsylla cheopis* (la puce du rat) lorsqu'elle n'a pas d'autre hôte disponible (lorsque les populations de rats sont décimées). D'autres arthropodes peuvent plus rarement servir de vecteurs.

L'infection après piqûre de puce se traduit par la **forme bubonique** typique. La bactérie se multiplie localement et est disséminée par voie lymphatique. Les ganglions du territoire de la piqûre, enflammés et hypertrophiés, constituent le bubon. La maladie évolue sous forme septicémique avec parfois localisation pulmonaire secondaire.

La contamination interhumaine peut s'effectuer par dispersion à partir des sécrétions bronchopulmonaires d'un sujet présentant une localisation pulmonaire secondaire. Elle entraîne alors chez le sujet neuf ainsi contaminé une **forme pulmonaire primitive**. Ce mode d'infection par aérosol a pu exceptionnellement être observé lors du travail en laboratoire.

B - *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*.

Elles sont responsables des yersiniooses, regroupant des manifestations pathologiques variées. Les infections à *Y. enterocolitica* sont les plus fréquentes.

1. Manifestations digestives

Ce sont les plus anciennement connues et de loin les plus fréquentes (grands enfants, adolescents et adultes). L'adénolymphite mésentérique est la forme la plus classique observée avec les deux espèces, se traduisant par un syndrome abdominal aigu douloureux de la fosse iliaque droite, pouvant être confondu avec une appendicite aiguë. L'infection sous forme d'iléite aiguë est moins fréquente.

Chez le jeune enfant (jusqu'à 6 ans environ), *Y. enterocolitica* est responsable de gastro-entérites dont le tableau clinique est comparable à celui observé avec les autres bactéries intestinales : fièvre, douleurs abdominales, diarrhée.

2. Septicémies

Les formes septicémiques sont plus rares et sont observées sur un terrain particulier (cirrhose, diabète, hémochromatose, hémopathies,...). Les infections systémiques sont plus fréquentes chez des sujets présentant une surcharge en fer. Le tableau clinique habituel des septicémies peut s'accompagner de localisations secondaires (hépatiques, abdominales, ganglionnaires).

En raison de son aptitude à se multiplier dans les poches de concentrés globulaires conservés à + 4°C *Y. enterocolitica* peut être responsable de chocs septiques transfusionnels consécutifs à une bactériémie chez le donneur.

3. Manifestations extra-digestives

Elles sont provoquées le plus souvent par un processus auto-immun :

- érythème noueux survenant après une infection *Y. pseudotuberculosis* chez l'enfant entre 8 et 15 ans ou après une infection à *Y. enterocolitica* chez la femme après 50 ans,
- polyarthrites ou arthrites réactionnelles succédant à un épisode d'entérite aiguë mais concernant dans la plupart des cas les sujets porteurs de l'antigène HLA-B27.

D'autres manifestations ont été occasionnellement décrites reposant sur des arguments sérologiques, syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, cardite, glomérulonéphrite, thyroïdite.

La fièvre scarlatiniforme d'Extrême-Orient due à *Y. pseudotuberculosis* et décrite depuis une trentaine d'années dans la partie la plus orientale de l'Union Soviétique n'a pas encore été observée en Europe.

V - PHYSIOPATHOLOGIE - FACTEURS DE VIRULENCE

Les *Yersinia* pathogènes possèdent en commun plusieurs facteurs de virulence. *Y. enterocolitica* fut la première espèce pour laquelle les capacités invasives ont été rattachées à la présence d'un plasmide, mécanisme maintenant commun aux *Shigella*, *Salmonella* et aux souches entéro-invasives d'*E. coll*.

Un plasmide de virulence (pYV) de 70 kb est présent dans les souches pathogènes. Plusieurs gènes plasmidiques codent des protéines de la membrane externe (Yop) dont l'antigène V ou W ; la synthèse de ces protéines est réalisée à 37°C en absence d'ions calcium, mais pas ou peu à 28°C. Ces protéines permettraient de résister à la phagocytose.

La protéine PI, produite indépendamment des ions calcium est constituée de sous-unités recouvrant, sous forme de fibrilles, la surface des bactéries. Codée par pYV, cette protéine serait le support de l'adhésion et protégerait la bactérie de l'action bactéricide du sérum.

Deux gènes chromosomiques responsables de l'invasion ont été identifiés. L'un, *inv*, présent chez *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* code une protéine de 103 kDa ou "invasine", produite à 28°C, présente à la surface de la bactérie et dans la membrane externe. L'autre gène chromosomique d'invasion est le gène *ail* (locus d'attachement et d'invasion) qui code une protéine de 17 kDa produite à 37°C. Seules les souches pathogènes possèdent *ail* alors que le gène *inv* est présent mais non fonctionnel chez les souches non pathogènes (de l'environnement) de *Y. enterocolitica*.

Les souches très virulentes, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* **0:8**, possèdent des protéines de haut poids moléculaire (190 kDa) synthétisées dans un milieu carence en fer. Le gène est absent chez les autres espèces et chez *Y. enterocolitica* **0:3** et **0:9**.

Y. enterocolitica produit à 28°C une entérotoxine aux propriétés identiques à celles de l'entérotoxine thermostable (ST) de *E. coli*. Le rôle de l'entérotoxine dans la pathogénie de l'infection n'est pas clairement établi car elle n'est pas produite à une température supérieure à 30°C.

L'uréase, par les altérations de la muqueuse produites par l'ammoniaque libéré à partir du contenu intestinal, participerait à la colonisation bactérienne.

De nombreux facteurs vont donc participer à la virulence de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. L'atteinte de la lamina propria s'effectuerait par l'intermédiaire de cellules épithéliales spécialisées dépourvues de bordure en brosse recouvrant les plaques de Peyer (cellules M) ou par l'intermédiaire des entérocytes.

Chez l'animal de laboratoire les espèces virulentes sont *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* (sérotypes 0:8, 0:9 et 0:3).

Chez l'homme, en particulier chez l'enfant, l'infection à *Y. enterocolitica* réalise un tableau de gastro-entérite et des signes d'infection systémique. La bactérie provoque une diarrhée selon un mécanisme entéro-invasif. La porte d'entrée se situe sur l'iléon terminal et le caecum au niveau desquels sont observées les principales lésions sous forme de zones inflammatoires et d'ulcérations dans la zone des plaques de Peyer. Les bactéries ont une multiplication intra-cellulaire dans les cellules de la muqueuse formant des granulomes inflammatoires et des micro-abcès qui évoluent vers la nécrose entraînant ulcérations et hémorragies. Les ganglions mésentériques sont aussi le siège d'une multiplication bactérienne dans les cellules mononucléées avec formation de granulomes inflammatoires ; l'adénite mésentérique peut parfois présenter un aspect pseudotumoral.

VI - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Les produits pathologiques

Le cas particulier de la peste ne sera pas envisagé ici. Les principaux prélèvements sont les selles, les ganglions mésentériques (plus particulièrement pour *Y. pseudotuberculosis*), l'appendice, le sang pour hémoculture et tout autre prélèvement selon les localisations. Les prélèvements peuvent être conservés au froid, qui, pour les produits plurimicrobiens, est utilisable comme moyen d'enrichissement.

B - Examen direct - Morphologie

Les *Yersinia* sont de petits bacilles à Gram négatif, parfois coccoïdes dont la morphologie est proche de celle des *Pasteurella*. Une coloration bipolaire est décelable, elle est plus prononcée pour *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*. Les bactéries sont mobiles à 22 - 29°C, mais immobiles à 37°C. *Y. pestis* est toujours immobile.

C - Culture - Caractères cultureux

La culture est possible sur milieux ordinaires (gélose nutritive). En 24 heures à 37°C, les colonies sont le plus souvent à la limite de la visibilité ; elles augmentent de taille en prolongeant l'incubation et peuvent ainsi être repérées beaucoup plus facilement. Toutes les espèces, après 48 heures d'incubation, présentent un certain polymorphisme des colonies.

Y. enterocolitica et *Y. pseudotuberculosis* sont des espèces psychrophiles et peuvent se multiplier à des températures comprises entre + 4 et + 10°C.

Les échantillons non contaminés sont mis en culture sur les milieux usuels. Pour la recherche de *Yersinia* dans les produits plurimicrobiens (selles, aliments,

environnement...) **des méthodes d'enrichissement** peuvent être utilisées, en particulier l'incubation à basse température (+ 4°C) pendant plusieurs jours ou semaines en milieu liquide (eau peptonée, tampon PBS).

La recherche de *Y. enterocolitica* par coproculture est facilitée par l'utilisation de milieux de sélection. Les milieux sélectifs contenant des sels biliars (gélose Mac Conkey, Hektoen, Wauters, SS, DCL) sont utilisables et incubés à 30°C. Il existe aussi des milieux rendus sélectifs par l'adjonction d'antibiotiques (milieu CIN : cefsulodine, irgasan, novobiocine) permettant de détecter de faibles quantités de *Y. enterocolitica* dans les selles.

Y. enterocolitica est présente dans les selles au cours de la diarrhée et peut y persister plusieurs semaines ou plusieurs mois après la guérison clinique. Elle pourra être recherchée à distance des manifestations aiguës, en particulier lors d'atteintes auto-immunes. Par contre, *Y. pseudotuberculosis* ne persiste pas dans le tube digestif après la cessation de l'épisode diarrhéique et n'est plus retrouvée dans les selles lorsque se manifeste l'adénite mésentérique.

D - Identification

Les *Yersinia* présentent les caractères généraux des *Enterobacteriaceae* : **il s'agit de** bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatifs, fermentant le glucose, oxydase négative et réduisant les nitrates en nitrites (sauf *Y. pestis* var. *medievalis* et le biovar 5 de *Y. enterocolitica*).

Les éléments importants de l'identification sont : l'absence de mobilité à 37°C et la mobilité en-dessous de 29°C. Selon les souches, la mobilité peut ne pas être observée lors de l'isolement et peut n'apparaître qu'après plusieurs subcultures.

La réaction de l'uréase est toujours fortement et rapidement positive (sauf *Y. pestis*).

Le test à l'ONPG est positif mais les souches ne possèdent pas de bêta-galactosidase.

L'absence de lysine-décarboxylase, d'arginine-dihydrolase, de phénylalanine-désaminase est constante. La production de H₂S et la culture sur citrate de Simmons sont négatives.

Il convient de souligner l'aspect thermo-dépendant des caractères phénotypiques en particulier pour *Y. enterocolitica*. Certains caractères comme la production d'acétoïne ou d'acide seront plus nettement et plus rapidement positifs après incubation à une température inférieure à 30°C. Les principaux caractères des espèces du genre *Yersinia* sont présentés dans le tableau I.

L'hétérogénéité biochimique de *Y. enterocolitica* permet de définir 5 chimiotypes (ou biovars) sur la base de caractères variables (production d'indole, fermentation du xylose, présence d'une lipase, réduction de l'esculine) (Tableau II).

Il n'existe pas d'espèce animale assez sensible pouvant aider à l'identification des souches de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Les principaux éléments du **diagnostic différentiel** devant une colonie lactose négative, et positive pour l'uréase reposent sur la recherche de caractères propres aux *Proteus* (PDA ou TDA, production d'H₂S). D'autres espèces comme les *Enterobacter* seront à différencier de *Y. enterocolitica*. Enfin les autres espèces de *Yersinia*, considérées il y a peu comme des souches atypiques de *Y. enterocolitica*, sont parfois d'identification moins aisée (voir Tableau I).

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES ESPÈCES DU GENRE *YERSINIA*

	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. kristensemi</i>	" <i>Y. ruckeri</i> "
Mobilité (25°C)		+	+	+	+	+	d
Lysine-décarboxylase	-						+
Ornithine-décarboxylase	-		+	+	+	+	+
Uréase		+	+	+	+	+	-
Citrate							
Simmons (25°C)	-			+	d		+
Vosges-Proskauer(25° 0	-		+	+	+	-	d
Production indole	-		d	+	+	d	-
iGT		d	+	+	+	+	+
Acidification							
.rhamnose		+	-	+	+	-	-
.saccharose	-		+	+	+	-	-
. a méthyl D glucoside	-		-	+	-	-	-
.sorbitol	-		+	+	+	+	-
.raffinose		d	-	+	-	-	-
.mélibiose	d	+	+	+	-	-	-
Test ONPG	+	+	+	+	+	+	+

TABLEAU n
DIFFÉRENTS CHIMIOTYPES (BIOVAR) DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Caractères	Biovar				
	1	2	3	4	5
Production indole	+	+	-	-	
Désoxyribonucléase				+	+
Lipase (Tween 80)	+				
Réduction nitrate en nitrite	+	+	+	+	
Acidification :					
. D xylose	+	+	+	-	
. Saccharose	+	+	+	+	d
. D-tréhalose	+	+	+	+	

E - Classification - sérotypes - lysotypes

La structure antigénique des *Yersinia* est complexe ; elles possèdent l'antigène commun des Entérobactéries. Certains antigènes sont des déterminants de virulence (fraction 1 d'antigène d'enveloppe, antigènes V et W) et ont été évoqués dans le chapitre correspondant.

Les souches des deux espèces, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont classées en sérotypes en fonction de la spécificité de leurs antigènes somatiques.

Y. pseudotuberculosis a été divisée en six types (I à VI) selon les antigènes O. Le chimiotype 1 est le plus fréquent. Il existe des réactions croisées entre le type II et le groupe B des *Salmonella*, le type IV et le groupe D des *Salmonella*, le type VI et *E. coli* 055. Il existe 5 antigènes flagellaires (a à e).

Chez *Y. enterocolitica*, 34 antigènes O et 20 antigènes H ont été décrits. Ils définissent des sérogroupes utiles pour les études épidémiologiques. Un petit nombre de sérogroupes est associé à une pathologie humaine ou animale. Une modification de la distribution des types des souches isolées dans les selles chez l'homme est observée depuis 1985. En effet, si 0:3 est toujours le plus fréquent, 0:9 semble en régression et

il y a une notable augmentation des souches de chimiotype 1 (0:6 ; 0:5...), réputées **non** pathogènes, dans d'authentiques syndromes diarrhéiques.

Il existe une distribution géographique particulière ; les souches 0:3 et 0:9 sont rencontrées en Europe, alors que les souches 0:8 sont les plus fréquentes aux USA.

Il existe des réactions croisées entre les *Brucella* et *Y. enterocolitica* 0:9.

Les études épidémiologiques peuvent être complétées par la lysotypie et il existe deux schémas de classification dont l'un, français, reconnaît 10 lysotypes (I à X).

F - Diagnostic indirect

Les recherches sérologiques sont utiles au diagnostic lors de manifestations extra-digestives. Elles explorent la présence d'anticorps agglutinants ou d'anticorps fixant le complément. Les antigènes utilisés sont les antigènes de type 1 à V pour *Y. pseudotuberculosis* et les antigènes 0:3 , 0:9 et 0:5 pour *Y. enterocolitica* dans une réaction d'agglutination en tube ou de microagglutination. La technique ELISA est utilisable.

Les titres supérieurs ou égaux à 200 par la technique d'agglutination classique et à 40 par microagglutination sont considérés comme significatifs.

Les réactions croisées entre le type 0:9 et les *Brucella* sont observées avec les deux méthodes. D'autres réactions antigéniques croisées notamment avec les *Salmonella* du groupe B ou du groupe D, et la présence d'anticorps chez des sujets apparemment sains font toute la difficulté de l'interprétation de la sérologie de routine. Il convient dans tous les cas de suivre l'évolution des anticorps spécifiques. Les anticorps augmentent une semaine après le début des symptômes et atteignent leur sommet la deuxième semaine de la maladie.

VII - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Y. pseudotuberculosis est habituellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatif : bêta-lactamines, aminoglycosides, tétracyclines,

Y. enterocolitica est naturellement résistant à l'ampicilline et aux céphalosporines de première génération par production à la fois d'une bêta-lactamase constitutive et d'une bêta-lactamase (céphalosporinase) inductible. De rares souches présentent une résistance acquise à d'autres antibiotiques. Comme pour les caractères biochimiques, l'expression de la résistance est dépendante de la température.

Lors d'infections graves, les antibiotiques utilisés seront choisis parmi ceux cités ci-dessus ou parmi les céphalosporines de troisième génération associées ou non à un aminoglycoside.

Il n'existe pas de prévention spécifique des yersiniooses.

BIBLIOGRAPHIE

CANTON Ph., ROCHE G., DUREUX J.B., « Les Yersiniooses », *Rev. Praticien*, 1983, 33, 2393-2411.

COVER T.L, ABER R.C., « *Yersinia enterocolitica* », *New Engl. J. Med*, 1989, **321**, 16-24.

MAZIGH D., « Les déterminants de virulence des bactéries pathogènes du genre *Yersinia* » *Bull Inst. Pasteur*, 1985,83,33-39.

MOLLARET H.H., ALONSO J.M., BERCOVIER H., « Aspects biologiques, diagnostiques et écologiques des Yersinioses », *Méd. Mal. Infect.*, 1982,**12**, 664-667.

MOLLARET H.H., WALLET P., GILTON A., CARNIEL E., DUEDARI N., Le choc septique transfusionnel à *Yersinia enterocolitica* *Med. Mal. Infect.*, 1989,**19**,186-192.

MOLLARET H.H., CARNIEL E., GUILVOUT I., « La fièvre scarlatiniforme d'Extrême-Orient », *Méd. Mal. Infect.*, 1990, **20**, 519-529.

PIEMONT Y., RASOAMANANJARA D., MINCK R., « Interprétation de la sérologie des Yersinioses, Problèmes de réactions croisées avec d'autres germes », *Méd. Mal. Infect.*, 1982,**12**, 668-671.

A signaler : « Les infections à *Yersinia pseudotuberculosis* et à *Yersinia enterocolitica* », Numéro spécial de la revue *Médecine et Maladies Infectieuses*, 1982, **12 bis**.

SECTION V — AUTRES BACILLES À GRAM NÉGATIF AÉRO-ANAÉROBIES

Chapitre XVII LES VIBRIONS

DEFINITIONS ET CLASSIFICATION

La famille des VIBRIONACEAE

Elle regroupe des bacilles à Gram négatif, mobiles par ciliature polaire ou mixte, aéro-anaérobies facultatifs, croissant sur milieux ordinaires, réduisant les nitrates en nitrites, fermentant les glucides et donnant une réaction d'oxydase positive.

Elle regroupe quatre genres : *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*, *Photobacterium*. Les Vibrionaceae sont des bactéries aquatiques. Les espèces des genres *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* sont rencontrées en pathologie humaine. Les bactéries du genre *Photobacterium* sont des bactéries de l'environnement.

Le tableau ci-dessous indique les principaux caractères différentiels de ces quatre genres.

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES DIFFÉRENTES VIBRIONACEAE

Caractères	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Photobacterium</i>
Ciliature	Pm	PI	Pm	Pm
Oxydase	+	+	+	d
Luminescence	d	-	-	+
ADH	-	+	+	+
Géladnase	+	-	+	-
Halophiie	d	-	-	+
Sensibilité 0/129	+	d	-	+
G+C pour 100	38-51	51	57-63	40-44

Pm : polaire monotriche

PI : polaire lophotriche

d : caractère variable

Le genre *VIBRIO*

Le genre *Vibrio* est maintenant bien individualisé, d'une part des genres énumérés précédemment, d'autre part des *Campylobacter* et des *Spirillum*, grâce à des critères morphologiques, métaboliques et au GC %, *Campylobacter* (28-35 %), *Spirillum* (36-65 %)

Les *Vibrio* sont des bacilles à Gram négatif généralement isolés, droits ou incurvés, assez courts (1,5 à 3,0 µm), parfois franchement coccobacillaires.

Quand ils sont cultivés en milieux liquides, ils sont mobiles par flagelles polaires entourés d'une gaine, monotriches ou plus rarement multitranches. En milieux solides, co-existence possible d'un double système de ciliature ; avec présence, en plus des flagelles à insertion polaire, de flagelles latéraux nus, de longueur d'onde plus courte que les précédents. Cette ciliature mixte s'accompagne souvent de phénomène d'envahissement (swarming).

Chimio-organotrophes, anaérobies facultatifs capables de métabolisme respiratoire et fermentatif ne dénitrifient pas, ni ne fixent l'azote.

Les *Vibrio* n'ont pas d'exigence nutritive particulière : ils sont isolés sur milieux ordinaires. La croissance est abondante en milieux peptonés simples. Mais les espèces halophiles ont besoin de sodium pour une croissance optimale, à la différence des espèces halotolérantes ne nécessitant que de faibles concentrations en NaCl.

Température de culture : 18-38°C, dans une zone de pH comprise entre 6 et 9.

On distingue des espèces halotolérantes

- *V. cholerae*
- *V. cholerae* non 0:1 ou NC (non cholérique) ou NAG (non agglutinable par le sérum polyvalent 0:1).
- *V. mimicus*

On distingue des espèces halophiles

- | | |
|---|-----------------------|
| - <i>V. fluvialis</i> | - <i>V. damsela</i> |
| - <i>V. metschnikovii</i> | - <i>V. hollisae</i> |
| - <i>V. anguillarum</i> , <i>V. vulnificus</i> | - <i>V. furnissii</i> |
| - <i>V. parahaemolyticus</i> | |
| - <i>V. fischeri</i> , <i>alginolyticus</i> , <i>costicolus</i> ... | |

Une autre distinction peut être faite selon que les espèces sont retrouvées ou non en pathologie humaine :

- soit comme pathogènes pour l'homme : *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*
- soit comme saprophytes ou opportunistes :

<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. metschnikovii</i>
<i>V. furnissii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. vulnificus</i>
<i>V. damsela</i>	<i>V. hollisae</i>	

VIBRIO CHOLERAE

C'est l'espèce type du genre *Vibrio*.

HISTORIQUE

Le choléra était jusqu'en 1817 une maladie endémo-épidémique limitée au delta du Gange avec quelques incursions en Chine et dans le Sud-Est asiatique.

A partir de 1817 se développe la première des 6 pandémies dues au vibron classique. C'est au cours de la 5^e pandémie que Koch a découvert à Calcutta (1884) l'agent du choléra: « Komma Bacillus ».

Entre 1910 et 1960, à part quelques épidémies (Egypte en 1957), le choléra semblait de nouveau limité aux Indes.

A partir de 1961, s'est développée la septième pandémie dont l'origine se situait dans l'archipel des Célèbes (Indonésie). Elle est due à un *V. cholerae* d'un biotype particulier, El Tor. Ce biotype isolé pour la 1^e fois en 1905 au Lazaret d'El Tor dans le Sinaï, avait été jusque là considéré comme pathogène et non épidémique. Depuis cette date, cette souche s'est étendue dans le Sud-Est Asiatique, au Moyen Orient et au Continent africain (Afrique du Nord, Afrique Noire...) où il se maintient. Le continent Sud américain est touché actuellement par cette pandémie (épidémie de choléra au Pérou en 1991).

Le vibron cholérique classique est réapparu en 1979 au Bangladesh. L'isolement à partir de 1974 à Guam de souches agglutinables par l'antisérum 0:1, mais non toxinogènes, a fait reconnaître à côté des *V. cholerae* toxinogènes toutes 0:1 (2 biotypes : classique et El Tor), l'existence de :

- *V. cholerae* 0:1 atypiques (du milieu extérieur) non toxinogènes.
- *V. cholerae* non-0:1 (non agglutinable par 0:1) déjà connus produisant des toxines responsables de diarrhées.

1 - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

L'agent du choléra est éliminé en grande quantité par les malades dans les selles, ainsi peut-on retrouver de 10⁶ à 10⁸ vibrions par ml de selles. Il est présent également dans les vomissements. On peut retrouver *V. cholerae* dans le milieu extérieur. Relativement fragile, ce germe persiste de façon éphémère dans les eaux d'étangs ou de rivières. Sa survie est prolongée dans les eaux salées (lagune, ...) ; il peut y survivre plus de 15 jours.

Il peut également persister dans certains aliments frais (lait, poisson...) durant **plus** de deux semaines.

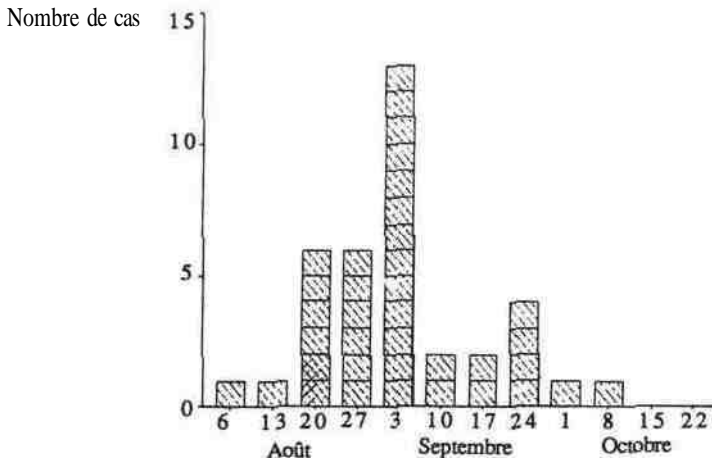
L'homme est le principal réservoir de vibrions cholériques, qu'il soit malade ou porteur « sain ». Le vibron est en général retrouvé durant 6 à 10 jours chez le porteur, parfois plus longtemps (porteur chronique). La contamination peut se faire surtout par contact manuel direct avec un porteur et surtout avec un malade ou un cadavre. Des travaux récents ont prouvé l'existence d'une niche écologique naturelle (à côté du réservoir humain). Les eaux d'estuaire et le zooplancton (USA, Europe, Inde...) qui s'y trouvent, constituent un réservoir naturel de *V. cholerae* surtout non 0:1, mais parfois même 0:1. Le zooplancton infecté peut être consommé par des fruits de mer (coquillages, crevettes, crabes et poissons) et les contaminer ; ceux-ci pourraient alors être à l'origine de cas sporadiques. De plus, dans un environnement défavorable, les cellules de *V. cholerae* sont capables de se transformer en microvibrions filtrables potentiellement pathogènes.

Dans les régions sèches, la transmission est uniquement interhumaine. En zone humide (côtière, lagunaire ou fluviale) la transmission est mixte, interhumaine et hydrique.

En zone sèche, les poussées sont plus explosives, pouvant toucher 30 voire 70 % de la population.

Les circonstances favorisant la diffusion de la maladie sont liées au bas niveau socio-économique et surtout aux mauvaises conditions de peuplement.

Quelques cas de choléra sont observés annuellement en France chez des voyageurs provenant de pays contaminés.



Source : *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* n°4411986

CHOLÉRA EN FRANCE (août à octobre 1986)

Le Monde Mercredi 3 septembre 1986..

ALGÉRIE

Le choléra a fait des dizaines de morts.

Alger - De nombreux foyers de choléra se sont déclarés dans différentes régions d'Algérie, faisant plusieurs dizaines de victimes parmi plus d'un millier de cas recensés sur l'ensemble du territoire, depuis le début de l'été. Aucune information officielle n'a été donnée sur l'apparition de la maladie, ce qui engendre les rumeurs les plus alarmistes parmi la population.

Le choléra a touché la plupart des régions du pays, y compris la capitale, indiquent des sources médicales qui se refusent toutefois à parler d'épidémie. Des foyers de méningite et de typhoïde ont été également recensés, en moins grand nombre cependant. Ces maladies, qui apparaissent chaque année, ont pris des proportions plus importantes à la faveur d'un été particulièrement éprouvant, marqué par une vague de chaleur sans précédent, qui a aggravé les conditions d'hygiène déjà précaires dans les campagnes et les quartiers populaires des grandes villes.

Dans certaines villes de l'intérieur du pays, qui souffrent cruellement du manque d'eau, la température a dépassé quarante degrés pendant plus d'un mois, alors qu'à Alger même, où des travaux sont engagés pour rénover un réseau de canalisations vétustes, les coupures d'eau quotidiennes dans certains quartiers sont fréquentes et souvent longues.

La presse algérienne appelle les habitants à respecter certaines règles d'hygiène pour se prémunir contre des maladies dont elle ne dit pas qu'elles aient fait des victimes. Elle a aussi violemment critiqué les responsables au niveau des communes, qui n'ont pas pris les mesures de prévention nécessaires en ne mettant pas d'eau de javel dans les réserves d'eau de boisson. Ces conseils semblent depuis avoir été suivis, notamment par les particuliers, puisque ce produit se fait rare aujourd'hui chez les droguistes - (AFP)

II - PHYSIOPATHOLOGIE

Après avoir franchi massivement la barrière gastrique, les vibrions se multiplient rapidement dans l'intestin ; ils traversent la couche de mucus et

adhèrent aux entérocytes par leurs antigènes d'attachement. L'entérotoxine libérée provoque le tableau du **choléra**.

Les symptômes du choléra sont liés à une fantastique perte de liquides et d'électrolytes par l'intestin. Le volume quotidien des selles peut parfois dépasser 20 litres et la composition des selles est pratiquement isotonique.

Cette fuite liquidienne n'est pas due à une invasion des entérocytes de la muqueuse intestinale (pas de lésion de la muqueuse, pas de copro-leucocytes, pas de fièvre, hémocultures négatives), mais à la production d'une entérotoxine CT (CT : choiera toxin) qui provoque l'accroissement du taux d'AMP cyclique dans les entérocytes entraînant une fuite d'eau et d'électrolytes dans la lumière intestinale. Ce mécanisme d'action est également celui observé pour la toxine LT (proche antigéniquement de la toxine CT) des *E. coli* E.T.E.C. Les IgG et IgA spécifiques présentes dans l'intestin peuvent avoir une action neutralisante sur le germe et sa toxine.

Les diarrhées dues aux *Vibrio non-0:1* sont provoquées, soit par leur toxine cholérique, soit par des entérotoxines analogues à celles d'*E. coli*.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Expérimental

1. Chez les animaux

Il est impossible de reproduire le choléra chez des animaux adultes après administration de *V. cholerae per os*. Par contre, administré par cette voie à des animaux nouveau-nés (lapin, chien) il est possible de reproduire la maladie.

En injectant de la toxine CT (environ 1 p.g) dans des anses ligaturées de lapin, on observe une fuite liquidienne vers la lumière intestinale. Ceci est obtenu tant avec la culture que le filtrat de culture de *V. cholerae*. Tout comme la toxine LT d'*E. coli*, l'exotoxine de *V. cholerae* produit un effet cytotonique sur cellules Y1 surréaliennes ou CHO (cellules ovariennes de hamster chinois).

2. Chez l'homme

Des essais aux USA ont été pratiqués sur des volontaires ingérant des souches de *V. cholerae* 0:1,

- il faut 10^8 à 10^{11} germes pour provoquer une diarrhée sévère chez 50 % des volontaires ;
- par contre, si l'administration *per os* est accompagnée de bicarbonate, 10^4 bactéries suffisent pour provoquer une diarrhée sévère chez 70 % des receveurs.

En effet, l'acidité gastrique normale détruit les vibrions. L'hypochlorémie dans les états de dénutrition peut expliquer également la colonisation intestinale. Seules certaines souches non 0:1 peuvent produire des diarrhées expérimentales chez des volontaires mais à des doses de 10^9 .

B - Naturel :

1. le choléra dû à *V. cholerae* 0:1

Le choléra est une maladie strictement humaine. La durée d'incubation varie de quelques heures à 5 jours selon la dose infectante.

LE CHOLERA EN 1989 DANS LE MONDE

Tableau 1. - Situation mondiale du choléra, 1983-1989

	1383	1384	1985	1386	1987	1988	1989
Nombre de pays nonfians le choléra	33	35	36	36	34	30	35
Nofflore de nouveaux pays infenes	—	—	—	1	—	—	2
Nombre as cas	64061	28 893	40 510	46 473	48 507	44083	48 403

source : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire n° 21/1990

— Cas de choléra notifiés à l'O.M.S., 1989		Asie	
Country/Ares — Pays/Territoire	Cases/Cas		
Afrique		China.....	5 158
Algérie.....	48 *	Hong Kong.....	29 (23 /)
Angola.....	17 601	Inde.....	5 026
Burundi.....	94 *	Indonésie.....	67
Cameroun.....	4	Japon.....	99 (37 /)
Kenya.....	918 *	Koweït.....	133 /
Libéria.....	26	Macao.....	3 /
Malawi.....	8 351	Malaisie.....	350
Mauritanie.....	700	Myanmar.....	597
Mozambique.....	371	Népal.....	141
Niger.....	166	Singapour.....	39
Nigéria.....	1 078	Viet Nam.....	143
Rwanda.....	1	Total.....	12 785 (196 /)
Sao Tomé-et-Principe.....	3 963	Europe	
République-Unie de Tanzanie.....	2 150	France.....	1 /
Zaire.....	99	Allemagne, République fédérale d'.....	1 /
Zambie.....	44	Norvège.....	1 /
Total.....	35 606	Espagne.....	3 / (2 /)
Amériques		Royaume-Uni.....	1 /
Canada.....	1 /	Yougoslavie.....	4 (2 /)
Total.....	1 /	Total.....	11 (8 /)
		World total — Total mondial.....	48 403 (205 /)

* Chiffres incomplets.
/ Cas importés.

1.1. Les formes graves

Elles réalisent un tableau typique avec un début brutal dominé par des douleurs épigastriques et abdominales, une sensation de malaise et une diarrhée entraînant rapidement des pertes liquidiennes importantes avec risque de déshydratation aiguë.

A la phase d'état, la diarrhée est caractérisée par des selles afécales faites de liquide clair, avec des flocons blanchâtres, aspect « eau de riz ». Elles sont sans odeur.

Le nombre de selles est variable : 10 à 50 selles par jour (3 à 15 litres peuvent être éliminés en 24 heures).

Les selles sont émises de manière incoercible ; le patient a des crampes musculaires liées aux pertes électrolytiques.

Ce tableau ne s'accompagne pas de fièvre, mais les vomissements sont fréquents.

En l'absence de réhydratation rapide et massive, l'évolution se fait vers un collapsus cardio-vasculaire avec anurie et acidose.

1. 2. Les formes bénignes

Elles ne sont pas exceptionnelles avec simple diarrhée (1 à 20 selles par jour), selles fécales, douleurs abdominales, sans vomissements et une déshydratation modérée ou nulle.

1.3. Les formes atypiques

Elles se voient surtout chez l'enfant, pouvant donner des formes pseudoméningées.

Chez l'adulte âgé ou débilité on peut rencontrer des cas de « choléra sec ». La mort survient avant l'apparition de la diarrhée. Des formes typhoïdiques peuvent se rencontrer.

Si le choléra est traité rapidement, la mortalité est de 1 à 5 % ; par contre, en l'absence de traitement, elle dépasse 50 % des cas.

2. Infections à *Vibrio cholerae* non-O:1

Les sérotypes de *V. cholerae* non-0:1 sont responsables de pathologies digestives : gastro-entérites, diarrhées simples ou cholériformes.

Les manifestations extra-intestinales sont observées surtout chez les immunodéprimés.

Les infections de plaies ou d'oreille font suite à des contacts avec l'eau de mer.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie et caractères culturels

- Classiquement : bacilles à Gram négatif, incurvé en virgule 2 p.m/0,5 μm, isolé, parfois groupé par 2 ou plus, mobile par cil polaire unique, non sporulé, non capsulé.
- **Des** morphologies atypiques peuvent être observées : sphères, aspects en poires, formes longues, incurvation manquante, voire formes immobiles.
- *V. cholerae* a un métabolisme aérobie préférentiel, anaérobie **facultatif**. **H** est peu exigeant
température optimale 30-40°C, résiste à 4°C.
 - . pH toléré 7,6-9,6, supporte les pH alcalins (milieux d'isolement)
 - . halotolérant (0,5-7 % de NaCl),
 - . résiste à la bile, aux sels biliaires et aux tensioactifs (milieux au Teepol)
- **Culture**
 - . milieux liquides : culture rapide avec voile en surface
 - . milieux solides : en 24 heures, colonies plates et transparentes, grisâtres, aspect non irisé en transillumination oblique.

B - Caractères biochimiques

- Métabolisme respiratoire : oxydase (+), catalase (+), nitrate-réductase (+)
- Métabolisme glucidique :
 - . glucose (+) fermenté sans gaz, saccharose (+)
 - . lactose (-) (ou lent), ONPG (+), arabinose (-)
 - . VP(-) pour biotype classique, (+) pour El Tor

- Métabolisme protéique :
 - . gélatine (+), indole (+). En eau peptonée nitratée, la présence simultanée de nitrite et d'indole produit en présence d'H₂SO₄ l'apparition d'une teinte rosé ou « choiera Roth ». Cette réaction historique n'est pas spécifique.
 - . LDC (+), ODC (+), ADH(-)
- Métabolisme lipidique :
 - . Estérase (+), lécithinase (+).
- L'hémolyse des globules rouges varie avec l'espèce animale et avec le biotype.

V. cholerae est sensible au composé vibriostatique 0/129 (2,4 diamino-6,7 diisopropylptéridine) et à la novobiocine.

Des souches résistantes au 0/129 ont été isolées au Zaïre et en Côte d'Ivoire. On sait que *in vitro* la résistance au 0/129 est transférable d'*E. coli* à *V. cholerae*. L'apparition de telles résistances ne sauraient donc surprendre ; elle complique le diagnostic.

C - Différenciation en biovars

On distingue au sein de l'espèce *V. cholerae* deux biovars, classique et El Tor. Les principales différences sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

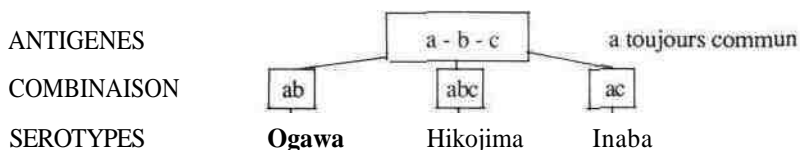
TABLEAU III
DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL ENTRE LES BIOVARS CLASSIQUE ET EL TOR

Biovar	<i>V. cholerae</i> classique	<i>V. cholerae</i> El Tor
Hémolyse (sang de mouton)		+
Polymyxine B (50 UI)	sensible	(- depuis 1970) résistant
Cholérages (Mukerjee)		
IV	+	
II		+

Récemment une sonde oligonucléotidique correspondant au gène *hly A* codant l'hémolysine a permis de distinguer les deux biovars plus efficacement que les tests classiques.

D - Constitution antigénique

- Ag flagellaire H thermostable, protéique
 - Il n'est pas spécifique et des communautés antigéniques avec d'autres vibrios existent. La sérotypie n'est pas utilisée en pratique.
- Ag somatique O thermostable, polysaccharidique.
 - Il existe plus de 100 sérogroupes O.
 - Les souches pathogènes de *V. cholerae* (biovar classique et El Tor) appartiennent au séro groupe O:1
 - Ce séro groupe O:1 comporte 3 spécificités antigéniques a, b, c aussi bien pour classique que pour El Tor ; la combinaison des antigènes aboutit à l'individualisation de 3 sérotypes, l'antigène a est toujours commun.



Les sérotypes Ogawa et Inaba sont le plus fréquemment isolés.

Il existe des communautés antigéniques entre 0:1 et d'autres espèces bactériennes (certains sérovars de *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella*, *Brucella*), d'où des réactions croisées possibles.

E - Substances élaborées

Le vibron cholérique élabore de nombreuses enzymes extracellulaires (lécithinase, protéase, neuraminidase et mucinase) qui jouent un rôle important en favorisant la traversée de la couche de mucus (mucinase) et l'entrée en contact du vibron sur la bordure en brosse des cellules intestinales.

Certaines substances jouent un rôle primordial dans l'adhésion aux cellules intestinales et dans la colonisation de celles-ci. Ce sont les pili ou fimbriae qui sont de deux types, l'un d'entre eux est appelé TCP (toxin coregulated pilus) car il est exprimé en même temps que la production de toxine CT.

L'hémagglutinine soluble (non inhibée par D-mannose et L-fucose) protéase qui clive la sous-unité A polypeptidique de la toxine CT à l'intérieur du pont disulfure en A1 et A2, de même qu'un facteur dit facteur accessoire de colonisation (ACF) jouent un rôle en tant que facteurs d'adhésion complémentaires.

L'antigène 0:1 et le glycocalyx, interviendraient dans la fixation et l'adhésion de la bactérie à l'entérocyte.

Comme le sérotype 0:1, les souches de *V. cholerae* non-0:1 produisent diverses enzymes extracellulaires : protéase, neuraminidase, mucinase... Une entérotoxine similaire à la toxine cholérique a pu être mise en évidence ainsi que des entérotoxines LT, ST, une cytolysine et une cytotoxine Shiga-like

F - Toxine cholérique

C'est le prototype des entérotoxines provoquant une diarrhée par activation de l'adénylate cyclase (AC) des cellules épithéliales de l'intestin grêle.

La toxine cholérique est une protéine oligomérique thermolabile classée dans le groupe des exotoxines vraies.

La toxine native (84 kDa) est constituée :

- d'une sous-unité A centrale (28 kDa) et
- de 5 sous-unités B périphériques (11,5 kDa).

La sous-unité A et les sous-unités B sont liées de manière non covalente.

La sous-unité A comporte deux chaînes peptidiques A1 (22,5 kDa) et A2 (5,5 kDa) liées par un pont disulfure. La sous-unité A2 servirait de séquence-signal de la translocation de la sous-unité A1 dans le cytoplasme.

Les sous-unités B se fixent aux gangliosides GM1 de la surface membranaire, ce qui entraîne un changement conformationnel de la toxine se traduisant par la création d'un canal hydrophile par lequel la sous-unité A est internalisée. La neuraminidase du germe transforme les di et trisialogangliosides membranaires en GM1.

La sous-unité A1 stimule l'adénylate cyclase. Le mécanisme d'action est le suivant : l'adénylate cyclase membranaire est stimulée par le complexe protéine Gs-GTP ; cette activation cesse suite à l'hydrolyse du GTP en GDP par l'activité GTPasique de la sous-unité a de la protéine Gs. La sous-unité A1 ADP-ribosyle la sous-unité a en inhibant son activité GTPasique. L'AC stimulée ainsi de manière permanente augmente considérablement le taux d'AMPc intracellulaire provoquant une fuite hydrique très importante par inhibition de l'absorption de sodium et en stimulant la sécrétion de chlore.

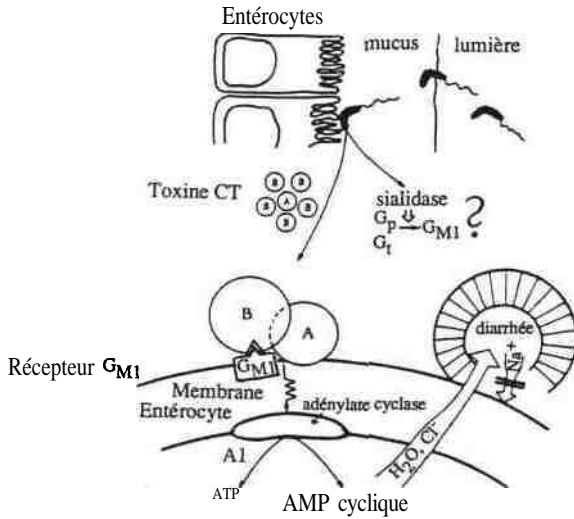


SCHÉMA 1
CIBLES MOLÉCULAIRES DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE DANS L'ENTÉROCYTE

CT : choiera toxin, GM₁ = monosialoganglioside, Gd = disialoganglioside, G_t = trisialoganglioside, AC = adénylate cyclase, Gs = unité régulatrice stimulante de l'AC (GTP binding protein), cm = calmoduline, PK = protéine kinase. Çà = réserves de calcium

- 1 : activité glycohydrolase
- 2 : activité ADP ribosyltransférase
- 3 : activité GTPase

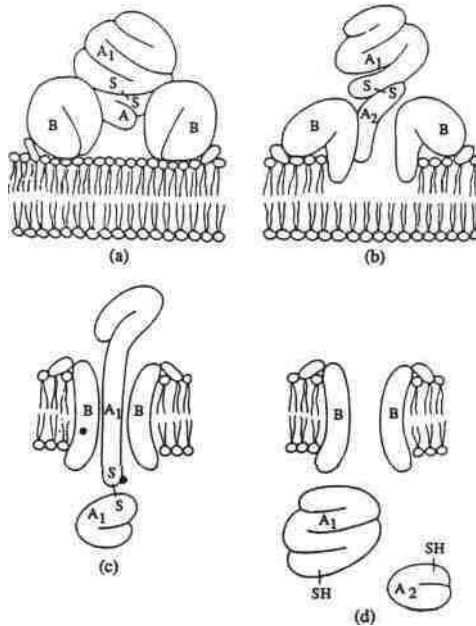


SCHÉMA 2
INTERNALISATION ET ACTION DE LA TOXINE CHOLÉRIQUE SUR L'ENTÉROCYTE

Schéma proposé par D. M. Gill pour expliquer le mécanisme d'entrée du fragment A de la toxine cholérique.

a ; les sous-unités B reconnaissent leur récepteurs spécifiques

b ; les sous-unités B induisent une modification de la conformation de la paroi et s'insèrent dans la membrane de l'entérocyte.

c ; un canal hydrophile se trouve ainsi créé qui permet le passage intracellulaire de la sous-unité A

d ; le pont disulfure est détruit et le fragment A1 peut activer l'adénylate cyclase dans le cytoplasme de l'entérocyte.

Les sous-unités A et B de l'entérotoxine CT sont codées par 2 gènes contigus *ctx A* et *ctx B* formant un opéron sur le chromosome. L'analyse des séquences montre 75 % d'homologie entre les gènes *ctx A* et les gènes *elt A B* codant la toxine LT des *E. coli* ETEC. Les souches de *V. cholerae* portent des copies multiples de l'opéron *ctx A B*. Le gène *tox R* responsable de l'activation de l'opéron *ctx A B* contrôle d'autres gènes impliqués dans la virulence, *tcp A* (pili), *omp V* (protéine membranaire) et ACF.

G - Lysotypie

On peut isoler dans les zones d'endémie, des vibriophages à partir des selles de malades, de porteurs sains, d'eaux d'égouts ou de rivières.

Ces phages permettent une lysotypie, 14 phages sont utilisés en pratique. Les types III, IV, V et VI sont spécifiques du biovar classique, les types I et II du biovar El Tor. La lysotypie fournit des renseignements intéressants en épidémiologie.

H - Sensibilité aux antibiotiques

Les transferts génétiques réalisés *in vitro* permettent d'obtenir des souches multirésistantes ; de telles souches pourraient survenir spontanément et déclencher des épidémies.

Des souches porteuses de résistances plasmidiques ont été isolées à Calcutta, mais aussi en Afrique du Nord, en Afrique noire, en U.R.S.S....

Les résistances signalées portent notamment sur les tétracyclines, les sulfamides, ce qui pose des problèmes de chimioprophylaxie et de traitement curatif. Sans toujours atteindre des niveaux de résistance élevés, ces souches se caractérisent assez souvent par une simple élévation de la CMI et par une certaine instabilité.

Il a été possible de transférer ces résistances plasmidiques à des *E. coli*.

Enfin les résistances à la colistine et à la polymyxine sont classiques pour El Tor.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Un examen bactériologique complet est réalisé en Europe et dans les pays industrialisés devant une suspicion de choléra mais il est évident qu'en zone d'endémie on se limite à des tests présomptifs.

1. Les prélèvements et leur transport

-*Prélèvements d'origine humaine* : on recherche le vibron cholérique dans les selles, les écouvillonnages rectaux, les vomissements, dans des prélèvements de contenu intestinal lors d'autopsies. Les hémocultures n'ont pas d'intérêt.

-*Prélèvements du milieu extérieur* :

- **eaux** : si légèrement trouble, concentration par filtration ;
 . si trouble, mélanger l'eau à de l'eau peptonée alcaline concentrée 10 fois, éventuellement par le procédé des gazes flottantes.
- égouts : milieux sélectifs
- aliments : ils doivent être homogénéisés et enrichis en eau peptonée alcaline.

L'idéal est de pouvoir ensemercer les milieux d'enrichissement et de culture sur place. Ceci n'est pas toujours possible et on peut déposer l'échantillon de selles sur du papier buvard ou filtre et l'expédier au laboratoire sous enveloppe scellée.

Si possible faire sur place un ensemencement en eau peptonée alcaline ou salée (2 % de NaCl) à pH 9, et envoyer le tube à vis au laboratoire.

2. L'examen bactériologique

a/ L'examen direct.

Il peut être évocateur si on observe entre lame et lamelle une mobilité « en banc de poissons » et au Gram une flore monomorphe à Gram négatif plus ou moins incurvée.

bl La mise en culture

Il est conseillé (schéma 3) d'ensemencer en parallèle des milieux d'enrichissement et d'isolement.

- **milieux d'enrichissement**, on peut utiliser :

- soit une eau peptonée alcaline à 1 ou 3 % NaCl

- soit un milieu taurocholate-tellurite-peptone.

Pour l'un ou l'autre milieu, on procède à un repiquage sur milieu solide après 6 à 8 heures d'incubation à 37°C (parfois on a recours à une 2^e étape d'enrichissement).

- **milieux d'isolement**, on utilisera en parallèle des milieux non ou peu sélectifs et des milieux sélectifs solides

- peu sélectifs : gélose nutritive avec 0,1 % de Teepol. Sur ce milieu, les colonies *d'eltor* sont non irisées, la production d'oxydase est conservée

- sélectifs : gélose TCBS (Thiosulfate-Citrate-Bile-Saccharose). Les colonies sont grandes, jaunes, convexes, fréquemment vertes si l'incubation est prolongée (El Tor).

La réaction de l'oxydase est aléatoire.

D'autres milieux sélectifs existent. Citons :

- Lauryl-sulfate-tellurite

- Désoxycholate-Citrate-Lactose

- Gélatine-Taurocholate-Trypticase-Tellurite (GTTT. Monsur)

En routine le milieu TCBS peut être conseillé. Il est assez sélectif et en règle générale, *Pseudomonas* et *Aeromonas* ne poussent pas. Par contre, des *Proteus*, des bacilles sporulés, voire des cocci, peuvent pousser en donnant des colonies jaunes.

Certaines souches de *V. cholerae* peuvent pousser sur gélose SS et sur Me Conkey.

cl L'identification

On repère les colonies suspectes, on étudiera au moins 5 colonies différentes.

- **Les tests présomptifs**

- oxydase (+), mobilité (+), Gram négatif

- agglutination sur lame avec sérum polyvalent anti 0:1 ; si négatif reprendre l'agglutination après chauffage à 100°C durant 2 heures. Puis utiliser des sérums spécifiques.

Ces tests peuvent éventuellement suffire en période épidémique, mais devant un cas isolé, en début ou en queue d'épidémie que l'on obtienne ou non une agglutination, il faut procéder à une identification complète.

- **Diagnostic de certitude**

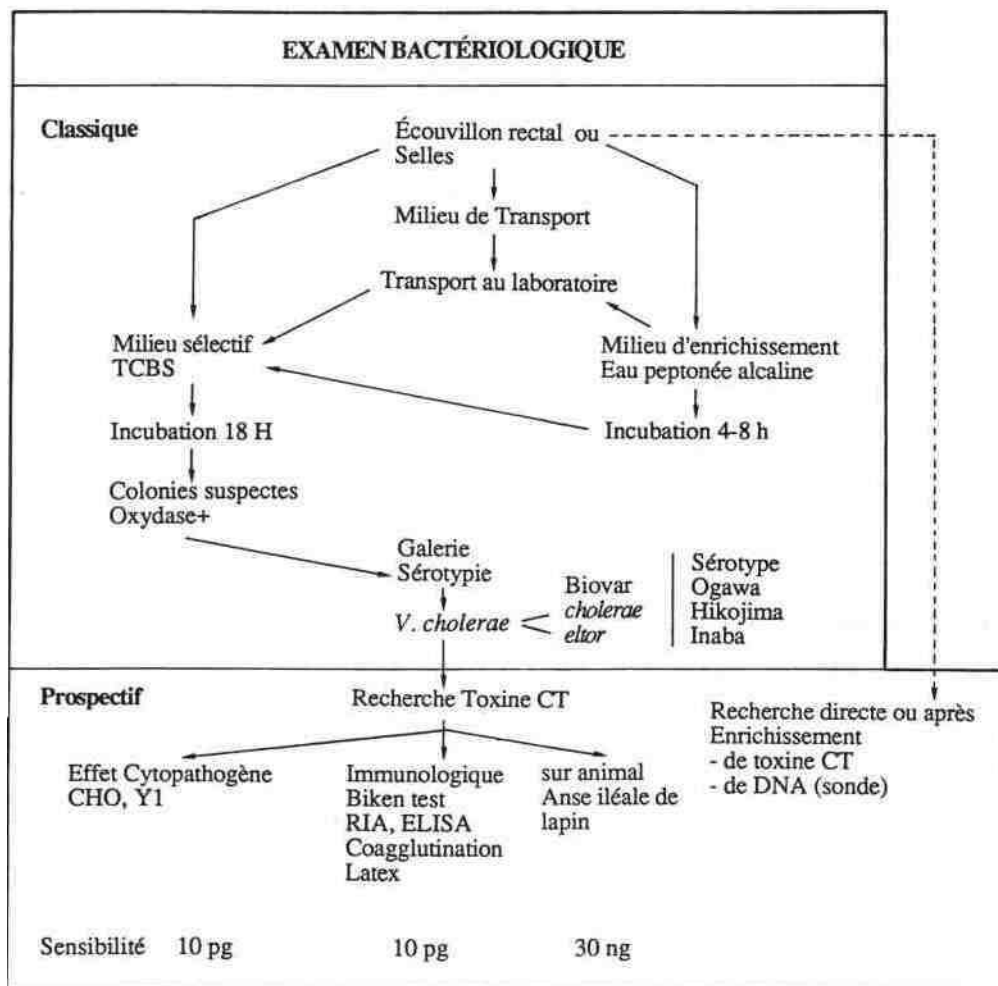
On procède à une galerie complète d'identification

- On écarte facilement les *Pseudomonas* qui sont aérobies, oxydase (+), et résistent au 0/129.

- Les *Aeromonas* et *Plesiomonas* sont plus difficiles à éliminer, mais ils sont ADH(+) et 0/129 résistant (*Aeromonas*), ou variable (*Plesiomonas*) (Tableau I).

Plus difficile est la différenciation avec les autres espèces de vibrions.

Les principaux caractères permettant cette distinction sont regroupés dans le tableau III. Parmi les *Vibrio* rencontrés assez fréquemment en pathologie humaine, le diagnostic différentiel se pose surtout avec *V. parahaemolyticus* (saccharose (-), ONPG (-), plus tolérant au NaCl) (Schéma 3).



SCHÉMAS
ÉTAPES DU DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DU CHOLERA :
DIAGNOSTIC CLASSIQUE ET PROSPECTIF

— **Diagnostic de biovar**

La différenciation entre biovar classique et El Tor repose sur les caractères mentionnés dans le tableau II, en outre El Tor est classiquement VP (+), et agglutine les globules rouges de poulet contrairement au sérovar classique.

— **Mise en évidence de la toxine CT**

Seules 67 % des souches isolées de choléra ou de sujets contacts sont CT positives. La recherche de la toxine peut se faire à partir des cultures en utilisant notamment des kits commercialisés utilisant la coagglutination ou l'agglutination de particules de latex (VET-RPLA). On peut aussi utiliser soit des techniques ELISA classiques, soit la réaction dite ELISA-GM1, soit enfin une technique dite GERYDO d'inhibition de l'hémadsorption sur le ganglioside GM1 ; ces techniques sont utilisées sur des cultures, mais des développements sont envisageables en recherchant directement la toxine sur les selles par ces procédés.

- *V. cholerae* **0:1** « atypiques »

Ce sont des souches agglutinables par les sérums polyvalents 0:1, mais non productrices d'entérotoxine. Elles peuvent présenter des anomalies par rapport aux souches épidémiques (fermentation lente du saccharose, comportement particulier vis-à-vis des phages). Ces souches se trouvent dans les eaux, les coquillages et parfois dans les selles de sujets sans diarrhée.

En plus de ces techniques classiques de diagnostic de choléra par isolement et identification de la souche, des recherches sont en cours permettant de rechercher la toxine cholérique non seulement sur les souches, mais aussi directement dans la selle cholérique, ou le gène codant la toxine par sonde ou amplification génique (PCR).

TABLEAU IV
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DE QUELQUES ESPÈCES HALOPHILES ET
NON HALOPHILES DE LA FAMILLE DES *VIBRIONACEAE*

	<i>V. cholerae</i> O1 et non O1	<i>V. mimicus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. costicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>P. shigelloides</i>	<i>A. hydrophila</i>
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Nitrate-réductase	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
Indole	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	d
Gaz (en glucose)	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	d
Test ONPG	+	+	+	+	-	-	-	+	+	[+]	+
TTR	-	-	ND	[-]	+	+	-	-	d	-	d
LDC	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
ODC	+	+	-	d	d	d	-	-	-	+	-
ADH	-	-	+	-	-	-	d	-	+	+	[+]
Mannitol	+	+	+	d	+	+	+	+	+	-	+
Inositol	-	-	+	-	-	-	d	-	-	+	-
Saccharose	[+]*	-	+	-	.*	+	+	+	+	-	+
VP	d	-	-	-	-	+	+	d	[+]	-	d
Géladnase	+	d	+	+	+	+	-	+	d	-	+
Sensibilité à 0/129	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Tolérance à NaCl (g%)	0-5	0-5	0-1.7	0-5.6	0-5.8	0,5-10	1-12	0,5-2,5	0,2-6	0-4	0-4

(+) ou (-) = caractère négatif ou positif de la majorité des souches

(d) = différents résultats observés

(ND) = non déterminé

(R) = résistant

(S) = sensible

- quelques souches avec caractère contraire

B - Diagnostic indirect

Vu le caractère d'urgence du choléra, la recherche des anticorps n'a pas d'intérêt pour le diagnostic. Elle n'est utile que pour surveiller l'immunité.

- Les agglutinines sont décelables à partir des 10-15^e jours. Il faut exiger une montée des anticorps ou un titre atteignant plus d'1/100 pour porter un diagnostic présomptif tardif.
- La recherche d'anticorps vibriocides : la combinaison vibrions + **sérum** contenant des anticorps + complément entraîne une lyse des vibrions. Une augmentation de ces anticorps est observée chez plus de 90 % des cholériques.

Le dosage des anticorps antitoxine connaît un regain d'intérêt car il permettrait de détecter non seulement les anticorps anticholériques, mais aussi ceux dirigés contre la toxine LT des *E. coll.* Plusieurs techniques sont proposées : immunohémolyse radiale, ELISA...

VI - TRAITEMENT

A - Préventif

1. Mesures d'hygiène

C'est une maladie quarantenaire à déclaration obligatoire. Il faut prendre des mesures d'hygiène individuelles et collectives.

Il faut faire bouillir l'eau, faire cuire les aliments. Se laver très soigneusement les mains, évacuer les excréments, même pour les sujets sains.

Pour les malades et les porteurs « sains », faire un dépistage, procéder à un isolement (5 jours), désinfecter linges, excréments, vêtements, lits, moyens de transport, prendre des mesures vis-à-vis des cadavres. Une chimiothérapie diminue la durée du portage.

2. Vaccins anticholériques

Après un choléra, la protection conférée est de l'ordre de 90 % ; ceci fait que très tôt, en 1885, Ferran a imaginé de protéger contre le choléra par un vaccin.

Actuellement plusieurs types de vaccins sont proposés.

al Vaccin à base de vibrions tués : (cellules entières)

- par voie parentérale : c'est le vaccin classique, disponible. Il contient dans chaque dose 4 000 millions de vibrions tués, Inaba et Ogawa. Ce vaccin donne
 - des réactions locales et générales modérées ;
 - une protection de l'ordre de 55 à 60 % durant 3 à 6 mois ; mais il n'est pas protecteur chez les jeunes enfants.
- une réponse immune avec production d'anticorps vibriocides circulants, d'anticorps agglutinants, mais pas antitoxiniques.
- par voie orale : des essais ont eu lieu en faisant prendre 10^{10} vibrions/jour durant 5 jours. La protection serait de l'ordre de 60 %.

bl Vaccins à base de constituants purifiés

Anatoxine (toxoid)

On peut utiliser de la toxine détoxifiée par :

- le formol
- le glutaraldéhyde
- la chaleur : le toxoid est chauffé à 65°C durant 5 minutes, ou mieux durant 25 minutes pour diminuer la toxine résiduelle (< 1 %).

Fraction purifiée

Dodin a proposé un vaccin administré *per os* fait de facteurs d'attachement de la bactérie aux cellules intestinales (petits peptides) et de LPS dont le polyside serait responsable du pouvoir vibriocide induit par le vaccin.

Sous-unité B purifiée

Ce type de vaccin provoque l'apparition d'IgA intestinales qui persistent plus longtemps si l'administration se fait *per os*. Cette approche est intéressante, mais insuffisante. Aussi Holmgren a-t-il proposé d'associer sous-unités B purifiées et vibrions tués, administrés par voie orale.

Un vaccin cholérique oral à germes entiers + sous unité B arrive au terme de son développement, administré à deux reprises à 4 semaines d'intervalle ; il confère une protection de 85 % durant les six premiers mois et de 63 % sur la première année. Au bout de trois ans, la protection est encore de

50 %. A noter que ce vaccin confère une protection nette, mais de courte durée contre les diarrhées à *E. coli* entérotoxigènes (ETEC).

cl Souches atténuées de V. cholerae

Souches naturellement atténuées. Les souches non toxigènes de *V. cholerae* 0:1 ne confèrent pas de protection.

Souches atténuées par mutagenèse :

- mutant hypotoxinogène obtenu par la nitrosoguanidine souche 569 B (M13) utilisée *per os*. Elle donne une protection de 60 %, mais a tendance à une reversion toxigène.
- autres mutants, telle la souche Texas-Star (3083) qui produit des sous-unités B, mais pas de sous-unité A. Utilisée *per os* elle entraîne l'apparition d'anticorps vibriocides (85 % des sujets) et antitoxiniques (25 %), la protection est inférieure à 75 % durant 1 à 2 ans. Parmi les inconvénients on peut noter une petite diarrhée lors de la vaccination, et on peut imaginer un éventuel retour à la virulence.

dl Souches recombinantes obtenues par génie génétique

Différents recombinants de *V. cholerae* ont été utilisés. Il a été possible de les obtenir car les gènes codant les sous-unités A et B de la toxine ont été séquencés ; on a obtenu des souches synthétisant uniquement la sous-unité B, d'autres ne synthétisant aucune des deux sous-unités... Ces vaccins sont en cours d'évaluation. Ils conféreraient une importante protection... mais nous manquons encore de recul pour juger les résultats.

Une autre approche a été tentée : on a introduit les gènes codant le LPS de *V. cholerae* dans une souche de *Salmonella typhi* avirulente (*S. typhi* Ty 21a), cette souche EX 845 est parfaitement avirulente, mais s'est révélée peu immunogène et non protectrice chez les volontaires.

3. Chimio prophylaxie

Elle n'est utilisable qu'en prophylaxie de courte durée (séjour court en zone d'endémie). Elle prévient la maladie et supprime le portage.

On utilise les sulfamides-retards (Fanasil®), ou les tétracyclines (doxycycline). Une surveillance des sensibilités du *V. cholérique* à ces antibiotiques est indispensable, vu l'existence de résistances.

B - Traitement curatif

Correctement traité le choléra n'entraîne qu'environ 1 % de décès, mais quand il survient dans des zones défavorisées, les structures sanitaires sont vite débordées devant plusieurs dizaines de cas quotidiens. La mortalité peut alors atteindre 50 %.

Le traitement curatif comporte :

- une **réhydratation** massive par voie parentérale par sérum physiologique et bicarbonaté en fonction de la déshydratation (souvent 5-6 litres perfusés en 3-5 heures), ou par voie orale (soluté de réhydratation orale : SRO de l'O.M.S.) ;
- une antibiothérapie dont l'intérêt est souvent mis en doute. Elle réduit l'importance et la durée de la diarrhée et raccourcit la durée du portage. On utilise les sulfamides, le triméthoprime-sulfaméthoxazole, le chloramphénicol ou les tétracyclines (sous réserve que la sensibilité de la souche épidémique ait été vérifiée).

AUTRES VIBRIONS

En dehors de *V. cholerae*, d'autres espèces de vibrions ont été retrouvées chez l'homme. Les principales d'entre elles sont décrites ci-dessous.

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Après *V. cholerae*, c'est l'espèce la plus importante.

I - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

Bactérie présente dans l'eau de mer, dans les eaux littorales, dans les poissons, les coquillages, les mollusques. *Vibrio parahaemolyticus* est responsable de diarrhées aiguës chez l'homme, consécutives à une ingestion d'aliments contaminés. La diarrhée débute 2 à 6 heures après le repas. Les selles sont souvent hydriques, parfois sanglantes, la température est peu élevée ; la diarrhée persiste 4 à 7 jours.

Ce *Vibrio* produirait une entérotoxine thermolabile, mais le mécanisme de la diarrhée est assez complexe et une action entéro-invasive combinée à l'entérotoxine n'est pas exclue.

II - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Prélèvements

La bactérie peut être recherchée à partir de selles, de fruits de mer frais ou congelés, ou d'eaux.

La recherche devra être systématique, même en France, à partir des selles, si on a la notion d'intoxication alimentaire consécutive à l'ingestion de produits d'origine marine.

B - Culture

Il est conseillé comme pour *V. cholerae* de procéder à un ensemencement double :

- de milieux d'enrichissement (eau peptonée salée 3 % NaCl)
- et de milieux d'isolement (TCBS)

(Les milieux d'enrichissement étant repiqués au bout de 6 à 18 heures sur milieux d'isolement).

Les incubations des milieux de culture se font à 30°C. On observe des colonies bleues-vertes sur TCBS. A noter que ces colonies peuvent se développer (lentement en 48 heures) sur divers milieux pour Entérobactéries (Drigalski, Mac Conkey, Hektoen, SS).

C - Morphologie

Bacilles droits, assez courts, très mobiles par ciliature polaire monotriche.

D - Caractères biochimiques

En dehors des caractères généraux communs avec les autres vibrions, ce vibron doit être différencié particulièrement, d'une part, de *V. cholerae* et *V. mimicus* et, d'autre part, de *V. alginolyticus*.

V. parahaemolyticus est VP(-), ONPG(-), saccharose (-), arabinose (+) alors que *V. cholerae* est VP variable, ONPG(+), saccharose (+), arabinose(-), et *V. alginolyticus* est VP(+), ONPG(-), saccharose (+), arabinose (-). La différence avec *V. mimicus* se fait sur le caractère ONPG(+) et l'halophilie modérée de cette espèce.

En outre, *V. parahaemolyticus* tolère 7 - 8 % de NaCl, alors que *V. alginolyticus* supporte jusqu'à 10 % de NaCl.

Un caractère est intéressant à rechercher pour les *V. haemolyticus* ; il s'agit de l'hémolyse p sur milieu de Wagatsuma, additionné de 5 % de sang défibriné humain ou de lapin. Si l'hémolyse est présente, les souches sont dites « Kanagawa + », c'est le cas des souches pathogènes pour l'homme. Celles provenant du milieu extérieur sont en général « Kanagawa - », sans que l'on sache la nature du lien hémolyse-virulence.

A noter que le gène *tdh* codant l'hémolysine thermostable de *V. parahaemolyticus* présente une forte homologie avec les gènes codant les hémolysines de *V. cholerae* non 0:1, *V. mimicus* et *V. hollisae* ce qui suggère un ancêtre commun.

E - Constituants antigéniques

On reconnaît 12 spécificités antigéniques O et 59 antigènes K. Selon les conditions de culture, deux types de flagelles sont observés, monotriche M ou lophotriche L. Il existe des communautés antigéniques entre les flagelles de *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* (flagelles M et L) et non avec de *V. cholerae* (flagelles M).

La sérotypie n'est pas réalisée en routine.

F - Sensibilité aux antibiotiques

Les souches sont résistantes à l'ampicilline, sensibles à la gentamicine et à la tobramycine, aux tétracyclines, au chloramphénicol et au triméthoprime-sulfaméthoxazole.

VIBRIO ALGINOLYTICUS

1 - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

Il s'agit d'un vibron halophile dénué de pouvoir entéropathogène, qui peut être isolé à partir d'infections cutanées (ulcères, cellulite), souvent à la suite d'un contact avec de l'eau de mer.

II - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

V. alginolyticus présente beaucoup de caractères communs avec *V. cholerae* hormis son caractère halophile très marqué. Il présente comme certains *Proteus* un caractère diffusible des colonies sur gélose au sang.

VIBRIO VULNIFICUS

1 - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

V. vulnificus est une espèce du milieu marin. Elle est responsable, chez l'homme, de deux types d'infections : une forme septicémique grave, survenant 24 heures après l'ingestion de fruits de mer, chez des patients à défenses compromises (cirrhose par exemple) et des formes cutanées consécutives à un traumatisme et un contact avec de l'eau de mer ou des aliments d'origine halieutique.

II - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Le caractère ONPG rapide, lactose positif et sa résistance constante à la colistine sont les éléments majeurs d'orientation vers ce diagnostic.

BIBLIOGRAPHIE

- CADOZ M., « Développement de vaccins contre les maladies diarrhéiques : situation actuelle et perspectives. », *Méd. Mal. Inf.*, 1989, **11** (n° spécial), 571-577.
- CLEMENS J.D., *et al.*, « Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh », *Lancet*, 1986, ii, 124-127.
- DAVID-PRINCE M., M'BOUP S., DENIS F., RICHARD C., BARIN F., DIOP B., DIOP MAR I., « Gastro-entérites à *Vibrio parahaemolyticus* au Sénégal », *Méd. Mal. Inf.*, 1980, **10**, 348-341.
- GERMANFİR R., « Bacterial vaccine », *Académie Press*, Orlando, 1984.
- HOLMGREN J., SVENNERHOLM A.M., « Mechanisms of disease and immunity in cholera : a review », *J. Inf. Dis.*, 1977, 136, S105-S112.
- JANDA J.L., POWERS C., BRYANT RG, ABBOTT S.L., « Current Perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. » *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 245-267.
- MORRIS J.G., TAKEDA T., TALL B.D. *et al.*, « Experimental non 0:1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in humans », *J. Clin. Invest.*, 1990, 85, 697-705.
- OMS (Groupe de travail). « Choléra et autres diarrhées associées à des vibrions », *Bull. de l'OMS*, 1981, **59**, 27-52.
- RICHARD C., GIAMMANCO G., POPOFF M., « *Vibrio parahaemolyticus*. Isolement et diagnostic biologique », *Ann. Biol. Clin.*, 1974, 32, 33-46.
- TAYLOR R.K. « Genetic studies of enterotoxin and other potential virulence factors of *Vibrio cholerae* » in "Genetics of bacterial diversity", Hopwood D.A., Chater K.F., *Académie Press, London*, 1989, 309-329.

Chapitre XVIII

AEROMONAS - PLESIOMONAS

Ces deux genres appartiennent à la famille des *Vibrionaceae* dont les caractères généraux ont été décrits dans le chapitre précédent.

LE GENRE AEROMONAS

Le pouvoir pathogène de ces bactéries de la famille des *Vibrionaceae* a été longtemps sous-estimé. Les infections sont le plus souvent d'origine hydrique. Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies dotés d'une oxydase, fermentant le glucose avec ou sans gaz, réduisant les nitrates en nitrites, mobiles par ciliature polaire ou immobiles, résistants au composé 0/129.

HISTORIQUE

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

1 - CLASSIFICATION

Certaines espèces d'*Aeromonas* ont été longtemps confondues avec des *Proteus*, des *Pseudomonas* ou des vibrions.

Les *Aeromonas* (GC % compris entre 57 et 63) sont actuellement classés dans la famille des *Vibrionaceae*, à côté des genres *Vibrio* et *Plesiomonas*. Certains auteurs proposent de les faire rentrer dans une nouvelle famille : les *Aeromonadaceae*.

Le genre *Aeromonas* est constitué par plusieurs espèces mobiles et immobiles, les principales sont les suivantes :

- les espèces mobiles :
 - A. hydrophila* (espèce type)
 - A. caviae*
 - A. veronii* (biogroupes *veronii* et *sobria*)
 - A. jandaei*
 - A. schubertii*
 - A. eucrenophila*

- les espèces immobiles : *A. salmonicida* (*ssp.*, *salmonicida*, *achromogenes*,
masoucida, *smithid*)
A. média

II - PHYSIOPATHOLOGIE

Les infections à *Aeromonas* sont souvent liées à une contamination d'origine hydrique. Les germes pénètrent généralement dans l'organisme à la suite d'une effraction, à la faveur d'un traumatisme ou par voie digestive grâce à une lésion de la muqueuse.

Les infections concernent souvent les sujets immunodéprimés. Le tableau peut être celui d'un choc endotoxinique, ou bien les manifestations sont liées aux toxines élaborées par la bactérie.

III - HABITAT

Les *Aeromonas* sont isolés fréquemment dans les **eaux douées** (bactéries dulçaquicoles), dans les eaux stagnantes, les eaux courantes, les eaux de boisson, les eaux de mer ou de lagunes recevant de l'eau douée et les eaux d'égout (concentration > 10 • ml). Ce sont des bactéries caractéristiques des eaux de surface. Ils peuvent se multiplier dans les eaux douées en fonction des conditions de température, de pH et de la teneur en éléments nutritifs, ils seraient de bons indicateurs de l'état trophique de ces eaux.

Leur présence est signalée dans divers aliments (huîtres, moules, coquillages notamment) et dans les sols.

Grâce à des recherches utilisant des milieux sélectifs, on a pu montrer l'existence d'un portage intestinal chez les animaux ou chez l'homme. Chez ce dernier le portage concerne 1 à 3 % des sujets en Europe ou aux Etats-Unis, et jusqu'à 8 à 16 % des enfants et 27 % des adultes dans des pays exotiques comme la Thaïlande.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

1. Chez, les animaux à sang froid (poissons, reptiles et batraciens)

Les *Aeromonas* provoquent des syndromes hémorragiques ; ils sont parfois responsables d'épidémies préjudiciables à la pisciculture (truites). *A. salmonicida* est responsable de la furonculose des salmonidés.

2. Chez l'homme

Les infections sont le plus souvent d'origine hydrique, plaie profonde après baignade dans une rivière, immersion, noyade... ou consécutives à l'ingestion d'aliments contaminés.

On reconnaît :

al Des infections cutanées

Elles sont à type de cellulites ou de surinfections de plaies, de brûlures et consécutives à un contact avec l'eau ou le sol. Des cas (rares) de gangrène gazeuse ont été décrits et constituent un piège thérapeutique.

bl Des diarrhées plus ou moins aiguës

Elles peuvent évoquer des syndromes cholériques, avec des selles aqueuses, non glaireuses et non sanglantes. Ces diarrhées sont retrouvées dans tous les points du globe notamment en zone tropicale (les voyageurs et les jeunes enfants sont souvent touchés) mais aussi en zone tempérée (1 % des selles à Strasbourg lors d'études systématiques), surtout en saison chaude.

Le pouvoir entéro-pathogène a été longtemps controversé car seuls 5 % des volontaires ingérant 5.10^{10} *Aeromonas* présentaient des signes digestifs dans certaines études. On considère maintenant que *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, et *A. caviae* peuvent se comporter comme de véritables pathogènes intestinaux.

cl Des septicémies

Elles sont souvent en rapport avec des maladies hépatiques (cirrhose), biliaires, pancréatiques ou des infections malignes notamment des hémopathies. Mais ces septicémies peuvent aussi survenir chez des sujets aux défenses immunitaires normales. L'origine est le plus souvent digestive, notamment au cours des chimiothérapies anti-cancéreuses.

Dans certains cas, la septicémie s'accompagne de lésions cutanées de type *ecthyma gangrenosum*. La mortalité dans les septicémies est de l'ordre de 50 %.

al D'autres infections peuvent être observées

Ce sont des infections pulmonaires après noyade, rarement des infections urinaires, péritonites, infections méningées, otites, endocardites, des infections oculaires.

Les infections sont soit monomicrobiennes, soit mixtes, en particulier dans les diarrhées.

Les patients présentant des affections hépato-biliaires sont plus prédisposés que les autres aux infections à *Aeromonas*. La pose de sangsues a été à l'origine de certaines infections à *Aeromonas*.

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Les *Aeromonas* sont des bacilles à Gram négatif de 1-4 p.m/0,6 prn, mobiles par ciliature polaire, habituellement monotriches ou immobiles (*A. salmonicida*). Ils peuvent prendre un aspect coccobacillaire ou en courtes chaînettes.

B - Caractères cultureux

Ce sont des germes aéro-anaérobies.

Le pH optimal est de 7 (culture entre 5,2 et 9,8) et la température optimale est en général de 30°C. Elle est en fait variable selon les espèces, ainsi *A. salmonicida* ne se développe pas à 37°C.

En 24 heures, sur milieu solide, on obtient des colonies de 1 à 3 mm translucides, ressemblant aux entérobactéries. La culture est possible sur milieux du type trypticase-soja ou gélose au sang, mais aussi sur milieux « sélectifs » Mac Conkey, EMB ou Drigalski (les colonies fermentent très inégalement le lactose).

Le milieu SS est très inhibiteur pour les *Aeromonas*, les colonies sont grêles et n'apparaissent qu'en 48 heures.

C - Caractères biochimiques

Ces bactéries sont oxydase (+) et réduisent les nitrates en nitrites.

Certains caractères sont communs aux différentes espèces :

- fermentation du glucose, saccharose (sauf *A. jandaei* et *schubertii*), maltose, tréhalose, mannitol (sauf *A. schubertii*). Caractère ONPG (+).
- Possession de DNase, gélatinase, production d'indole. Caractère ODC (-) (sauf *A. veronii veronii*)
- résistance au composé vibriostatique 0/129

Le diagnostic des espèces les plus courantes repose sur les caractères différentiels indiqués dans le tableau I.

La recherche des décarboxylases chez ces espèces peut poser certaines difficultés en raison de la différence de sensibilité des milieux réactionnels. Le milieu de Fay et Barry (Appl. Microbiol., 1972, 23, 710-713) serait plus adapté à cette recherche (30°C, 24 H) que le milieu de Moeller.

TABLEAU I
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES *AEROMONAS* ET *PLESIOMONAS*

	<i>A.</i> <i>hydrophila</i>	<i>A.</i> <i>caviae</i> biotype <i>sobria</i>	<i>A.</i> <i>veronii</i> biotype <i>veronii</i>	<i>A.</i> <i>veronii</i>	<i>A.</i> <i>salmonicida</i>	<i>P.</i> <i>shigelloides</i>
Gaz en glucose	+	-	+	+	<i>d</i>	
V.P.	+	-	<i>d</i>	+	-	
Esculine	+	+	-	+	<i>d</i>	
L-arabinose	+	+	-	-	<i>d</i>	
Mannitol	+	+	+	+	<i>d</i>	
Saccharose	+	+	+	+	<i>d</i>	
Salicine	+	+	-	+	<i>d</i>	
ONPG	+	+	+	+	<i>d</i>	+
ODC	-	-	-	+		+
ADH	+	+	+	-	+	+
Indole	+	+	+	+	<i>d</i>	+
Géladnase	+	+	+	+	+	
Sensibilité au composé vibriostatique 0/129	-	-	-	-		<i>d</i>

D - Substances élaborées, facteurs de virulence et hypothèses physiopathologiques

Pigment : *A. salmonicida* et *A. hydrophila* donnent des colonies brunâtres ou vert foncé au bout de 2 à 5 jours d'incubation. Ces espèces synthétisent un pigment mélanique à partir de la tyrosine et de la phénylalanine.

Les facteurs de virulence identifiés chez *Aeromonas* sont nombreux, en dehors des enzymes favorisant l'infection : protéases, élastase, DNase, phospholipases, lipase, ils présentent des capacités d'adhésion et produisent diverses toxines.

- **La capacité d'adhésion** qui constitue la première étape avant la colonisation de la muqueuse intestinale, a été montrée à l'aide des cellules HEP-2 (modèle d'étude pour la pathogénie des infections à *E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*). Il existe deux types de pili : **pili-L** (pili longs, fins, flexibles, polypeptide de 4 kDa) et **pili-S** (courts, épais, polypeptide de 17 kDa). Le pouvoir d'adhésion est lié à la présence de pili-L qui sont impliqués dans le pouvoir pathogène, les souches de l'environnement sont peu adhérentes et présentent des pili-S.
- **Les souches entérotoxigènes** produisent des lectines spécifiques de l'acide sialique permettant la colonisation des surfaces intestinales. Il existe des souches entéroinvasives d'*A. sobria* et *A. hydrophila* (excepté les souches environnementales).
- **Les toxines** appartiennent à plusieurs types. On distingue d'une part les hémolysines ou cytotoxines et les entérotoxines ou cytotonines.

Il existe deux hémolysines :

- **une alpha-hémolysine** (65 kDa) non produite au delà de 30°C
- **une bêta-hémolysine** (50 kDa) produite en plus grande quantité à 37°C encore appelée aérolysine ou ASAO-hemolysin. Thermolabile, elle est cytotoxique pour de nombreuses lignées cellulaires et produit une accumulation hydrique dans l'anse iléale isolée ; elle serait le principal facteur de virulence impliqué dans les diarrhées.

La nature des **entérotoxines** d'*Aeromonas* a fait l'objet de nombreuses controverses. On a décrit :

- une **entérotoxine cholériforme** (63 kDa) neutralisée par un sérum anti-toxine cholérique produite par 5 à 10 % des souches d'*A. hydrophila*. Cette toxine cytotonique (sur cellules Y1) a des communautés immunologiques avec la toxine cholérique et stimule la production d'AMPc.
- une **entérotoxine** cytolytique (52 kDa) qui réagit avec l'antitoxine cholérique mais n'est pas neutralisée ; ses activités cytolytique et hémolytique sont corrélées et sa séquence N-terminale est identique à celle de l'aérolysine.
- une **entérotoxine cytotonique** (15 kDa) assez stable à la chaleur produite par la majorité des souches d'*A. hydrophila* et *A. sobria* et 10 % environ d'*A. caviae*, active sur l'intestin de souriceau nouveau-né.
- **une entérotoxine cytotonique et cytotoxique** (50 kDa) thermostable **non** neutralisée par un sérum anti-toxine cholérique et vérotoxique produite par la moitié des souches d'*A. hydrophila* et *A. sobria*.

L'étude de ces toxines s'est révélée difficile, il semble actuellement (bien que ceci ne soit pas encore fermement établi) que les entérotoxines cytotoniques et les entérotoxines cholera-like soient très voisines génétiquement et, de même, que l'entérotoxine cytolytique et la bêta-hémolysine soient également proches. Seules des différences d'expression *in vivo* ou *in vitro* modifieraient la toxinogénèse se traduisant par une variation de l'activité entérotoxique ou cytotoxique selon le type de cible tissulaire.

Certaines souches d'*Aeromonas* mobiles (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) cultivées en bouillon contenant 0,5% de glucose montre une inhibition de la croissance consécutive à l'accumulation d'acides gras et d'acétate entraînant la répression du cycle de Krebs. Ce "**phénomène suicide**" est corrélé avec la température de croissance et il a été démontré que seules les souches non-suicide

étaient virulentes et entéropathogènes. Ce phénomène suicide a été rapproché de la présence d'antigènes protéiques de surface thermostables rendant les souches autoagglutinables, résistantes à l'acide acétique, et considérées comme les plus virulentes.

L'étude de la **physiopathologie** des infections à *Aeromonas* est complexe : l'entéropathogénicité des souches d'*Aeromonas* est due à l'intervention simultanée de plusieurs facteurs physiologiques, métaboliques, antigéniques et toxiques. La présence d'*Aeromonas* dans une coproculture ne signifie pas forcément qu'elle soit entéropathogène, selon que la souche sera suicide ou non, elle s'implantera, selon qu'elle sera entéroadhérente ou entéroinvasive ou qu'elle produira une toxine cholera-like ou cytolytique on observera soit une infection intestinale peu importante, soit plus grave voire chronique.

E - Structures antigéniques

Les *Aeromonas* possèdent tous des antigènes O. Les espèces mobiles ont en outre des antigènes H.

Les techniques d'agglutination ou d'hémagglutination indirecte ont été utilisées pour tenter une sérotypie des *Aeromonas*.

Si l'espèce *A. salmonicida* semble homogène sur le plan antigénique, une grande hétérogénéité a été observée au sein des autres espèces. De plus un nombre non négligeable de souches présente une agglutination spontanée. Les souches du groupe O:11 d'*A. hydrophila* sont autoagglutinables et sont impliquées dans plus de 50 % des septicémies et des infections de plaies.

Il existe des réactions croisées entre les différentes espèces d'*Aeromonas*, entre *P. shigelloides* et *A. hydrophila* ou *A. sobria*.

F - Lysotypie

Un schéma provisoire de lysotypie a été proposé par Popoff. A noter qu'il existe un phage actif sur toutes les souches de *A. salmonicida*, ce qui peut avoir un intérêt pour le diagnostic.

VI - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produits pathologiques

Les isollements, en dehors de recherches systématiques, sont souvent le fait du hasard. Les principaux produits pathologiques sont : les hémocultures, les pus, les urines, LCR, liquides de ponction, les selles...

Les recherches peuvent être effectuées sur les eaux ou les aliments.

B - Isolement

L'isolement peut facilement être obtenu sur milieux non sélectifs (trypticase-soja, gélose au sang) si le produit pathologique est monomicrobien. Pour les prélèvements polymicrobiens, par contre, on doit utiliser des milieux sélectifs, en particulier pour les selles. Divers milieux d'isolement solides ont été préconisés : gélose dextrine-fuschine ; xylose-désoxycholate de sodium- citrate ; Mac Conkey au tréhalose à la place du lactose ; gélose inositol - vert brillant - sels biliaires (IBB) ; gélose amidon - glutamate - ampicilline - pénicilline (SGAP - 10 C) pour

les échantillons d'eaux polluées. A noter que le milieu TCBS n'est pas assez sélectif. En fait, pour une coproculture, on peut simplement utiliser une gélose trypticase - soja au sang de mouton (5 %) contenant de l'ampicilline (20 mg/l) ou encore la gélose CIN : cefsulodine (4 mg/l) irgasan - novobiocine. Les milieux liquides sélectifs d'enrichissement (eau peptonée alcaline à pH 8,6 et ampicilline, par exemple) ne présentent pas d'intérêt car il n'y a pas de corrélation avec la clinique.

Les principaux diagnostics différentiels se posent avec les Vibrions, les *Plesiomonas* et les *Pseudomonas*. La fermentation des sucres, le caractère oxydase (+) et la résistance au 0/129 orientent le diagnostic. Les principaux caractères différentiels sont la production de gaz en milieu contenant du glucose, l'hydrolyse de l'esculine, la fermentation de l'arabinose, le VP et l'ONPG.

VII - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Les *Aeromonas* sont sensibles aux cyclines, au chloramphénicol, aux aminosides et à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole. Le comportement vis-à-vis de la colistine est variable selon les souches (CMI entre 1 et plus de 64 mg/l).

Parmi les bêta-lactamines, une résistance est régulièrement observée pour l'ampicilline, mais aussi pour la carbénicilline, la ticarcilline ou la pipéracilline. *A. hydrophila* et *A. caviae* sont également résistants à la céfalotine, mais *A. sobria* est relativement sensible. Par contre, le latamoxef et les céphalosporines de 3^e génération (céfotaxime, ceftriaxone) sont constamment actives. Mais certaines souches d'*Aeromonas* sp. peuvent posséder plus de 2 bêta-lactamases inductibles leur conférant une résistance élargie aux céphalosporines de 3^e génération, à l'aztréonam et à l'imipénème.

Ces germes sont également sensibles à l'acide nalidixique et très sensibles aux fluoroquinolones. Les formes septicémiques requièrent souvent un traitement associant céphalosporine de troisième génération ou une fluoroquinolone avec un aminoside.

Le traitement des diarrhées peut nécessiter une réhydratation, mais l'antibiothérapie est en général inutile.

LE GENRE PLESIOMONAS

Il n'existe qu'une seule espèce : *P. shigelloides*.

1 - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

P. shigelloides est présent dans les eaux (toute l'année en zone tropicale ou subtropicale, en été ou automne en zone tempérée) et chez divers animaux. Il est isolé dans des selles de sujets diarrhéiques surtout en zone tropicale, occasionnellement en Europe. Des hypothèses physiopathologiques sur ces formes de diarrhées ont été avancées. Leur caractère invasif ou entérotoxique n'est pas précisé. Il n'y a pas d'homologies de séquence de l'ADN avec les gènes codant les

entérotoxines connues. Toutefois, on commence à étudier certains facteurs de virulence potentiels (cytotoxine ou cytolytine).

P. shigelloides est impliqué dans des infections chez l'homme, les poissons et probablement d'autres animaux.

Chez l'homme on retrouve parfois des facteurs prédisposants : maladies sous-jacentes (cancer, cirrhose), traitements anti-acide ; et des sources de contamination tels que contacts avec des eaux douces ou de mer, ingestion de fruits de mer crus ou mal cuits, ou de conserves de poisson avariées.

Le fait que l'ingestion de *P. shigelloides* par des volontaires ne provoque pas de maladie laisse penser que cette espèce n'aurait de pouvoir pathogène qu'en association avec un autre agent.

P. shigelloides a été isolé dans divers tableaux :

- des gastroentérites (forme la plus fréquente) chez l'enfant ou l'adulte de préférence (à l'opposé d'*Aeromonas*), prenant soit un aspect cholériforme, soit plus rarement un aspect dysentérique ; les cas peuvent être isolés mais on peut assister à de petites épidémies, des formes subaiguës ou chroniques peuvent s'observer, évoluant de 14 jours à 2 ou 3 mois.
- des formes extra-intestinales, rares. Des cas de méningites, septicémies, cellulites, arthrites ou ophtalmies ont été signalées.

II - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Caractère morphologique

Bacilles mobiles par une ciliature polaire, généralement lophotriche.

B - Caractères cultureux

Ils poussent bien à 37°C, mais ils ne se développent pas en bouillon CINa à 6,5 %. La culture sur les milieux usuels classiques pour les bactéries entériques peut être inhibée. Le milieu sélectif inositol - vert brillant - sels biliaires (IBB) peut être employé pour les coprocultures. Dans une diarrhée authentique le germe sera en culture pure.

C - Caractères d'identification

Fermentent le glucose sans production de gaz.

Oxydase (+), sensibilité fréquente au 0/129.

Les *Plesiomonas* sont ODC (+), LDC (+), ADH (+) et les principales caractéristiques biochimiques sont indiquées dans le tableau I.

Une classification antigénique a été proposée par Sakasaki comportant 107 sérovars. Certains groupes 0 donnent des réactions croisées avec les antigènes de *Shigella* ou d'*Aeromonas*.

IV - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

P. shigelloides est fréquemment résistant aux amino-, carboxy- et uréido-pénicillines, mais il est sensible à d'autres antibiotiques (imipénème, aztréonam...). De nombreuses souches produisent une pénicillinase codée par un plasmide, les inhibiteurs de bêta-lactamases (sulbactam, acide clavulanique,

tazobactam) restaurent l'activité des bêta-lactamines. *P. shigelloides* est en général résistant aux aminosides, la nétilmicine restant active.

Dans les gastroentérites les traitements les plus couramment employés sont à base de tétracyclines, de triméthoprime-sulfaméthoxazole, ou de fluoroquinolones (ciprofloxacine).

BIBLIOGRAPHIE

- ALTWEGG M., GEISS H.K., « *Aeromonas* as a human pathogen », *CRC Critical Rev. Microbiol.*, 1989, **16**, 253-286.
- BAKKEN J.S., SANDERS C.C., CLARK R.B., HORI M., « p-lactam résistance in *Aeromonas* spp. caused by inducible p-lactamases active against penicillin, cephalosporins and carbapenems », *Ant. Agents Chemother.*, 1988, **32**, 1314-1319.
- BLOCH S., MONTEIL H., « Purification and characterization of *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin », *Toxicon*, 1989, **27**, 1279-1287.
- BRAUER C., SCHEFTEL J.M., RIHN B., MONTEIL H., « Isolement d'*Aeromonas hydrophila* dans les diarrhées ; caractérisation des souches entérotoxigènes et relation cliniques », *Ann. Biol. Clin.*, 1985, **43**, 725-731.
- FASS R. J., BARNISHAM J., « *In vitro* susceptibilities of *Aeromonas hydrophila* to 32 antimicrobial agents », *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1981, **19**, 357-358.
- HOLMBERG S.D., FARMER III J.J., « *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections », *Rev. Infect. Dis.*, 1984, **6**, 633-639.
- JANDA J.M., « Récent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas* », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 397-410.
- KHARDORI N., FAINSTEIN V., « *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents », *Ann. Rev. Microbiol.*, 1988, **42**, 395-419.
- MANDJEE A., DARBAS H., ROUSSENQ - JEAN A., BOYER G., JEAN-PIERRE H., « *Aeromonas hydrophila* : circonstances d'isolement et discussion du rôle pathogène à partir de 8 observations », *Méd. Mal. Infect.*, 1987, **10**, 574-576.
- PICARD B., ARLET G., GOULET Ph., « Septicémies à *Aeromonas hydrophila*. Aspects épidémiologiques. Quinze observations » *Presse Méd.*, 1984, **13**, 1203-1205.
- POPOFF M., « *Aeromonas* » in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th Ed. Vol 1-Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1984.
- REINHARDT J.F., GEORGE L., « Comparative *in vitro* activities of selected antimicrobial agents against *Aeromonas* species and *Plesiomonas shigelloides* », *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985, **27**, 643-645.
- RICHARD C., LHUILLIER M.M., LAURENT B., « *Plesiomonas shigelloides*, une vibronacée entéropathogène exotique », *Bull. Inst. Pasteur*, 1978, **76**, 187-200.

Chapitre XIX

PASTEURELLA

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

1 - CLASSIFICATION

La famille des *Pasteurellaceae* regroupe les genres *Pasteurella*, *Haemophilus* et *Actinobacillus*.

Des travaux taxonomiques récents, basés sur des expériences d'hybridation ADN/ADN, aboutissent d'une part à classer comme *Pasteurella* des souches exigeantes en facteur V et d'autre part tendent à écarter du genre *Pasteurella* des espèces qui y étaient jusqu'à présent incluses : *P. haemolytica*, *P. pneumotropica*, *P. aerogenes* et *P. ureae*.

Le texte ci-dessous est consacré à l'espèce-type *P. multocida*. Les caractères de quelques espèces voisines qui sont des *Pasteurella stricto sensu* et peuvent être isolées chez l'homme (*P. dagmatis*, *P. canis*) seront signalés.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Pasteurella* sont des parasites obligatoires des muqueuses des cavités naturelles des vertébrés. Elles sont trouvées avec une grande fréquence dans la cavité buccale et dans la salive d'un grand nombre d'espèces animales : chiens, chats, chevaux, porcs, sangliers, etc.

Incapables de survivre longtemps dans le milieu extérieur, les *Pasteurella* sont généralement transmises à l'homme par un animal.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pour l'homme

7. La pasteurellose d'inoculation

La plus fréquente, elle est généralement consécutive à une morsure ou une griffade d'un chien ou d'un chat. Toutes les morsures ne sont pas le point de départ d'une

pasteurellose d'inoculation, mais les inoculations au niveau de la main semblent plus graves.

Stade aigu.

Après une incubation brève, de 3 à 6 heures, des douleurs très violentes apparaissent aux points d'inoculation qui deviennent très inflammatoires. L'inflammation s'étend aux articulations de voisinage. La fièvre est inconstante. Une adénopathie satellite est rarement observée. En l'absence de traitement adapté, la douleur et l'inflammation diminuent spontanément, mais l'impotence fonctionnelle persiste.

Stade chronique.

Quatre à six semaines après l'inoculation, les lésions cutanées sont guéries/mais un syndrome algo-dystrophique rebelle à toute thérapeutique persiste et constitue une véritable infirmité. Il n'y a pas d'adénopathie satellite contrairement à la lymphoréticulose d'inoculation.

2. Autres formes de pasteurellose.

Elles surviennent surtout chez des individus qui ont une maladie sous-jacente. On peut observer des septicémies, endocardites et méningites. *P. multocida* peut être isolée de pus divers : otite, sinusite, péritonite, adénite. Des infections pleuro-pulmonaires ont été signalées, notamment chez des éleveurs de porcs.

B - Pour l'animal

P. multocida est responsable de septicémies chez les volailles, de pneumopathies chez les lapins et les ruminants. La rhinite atrophique du porc où *P. multocida* est souvent associée à *Bordetella bronchiseptica* est la cause de pertes économiques importantes.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

A partir de souches responsables de rhinite atrophique, il a été possible de mettre en évidence une toxine ayant un pouvoir dermonécrotique et ostéolytique. Cette toxine peptidique localisée dans le cytoplasme est codée par le gène *tox A* qui a été clone. Injectée à des porcs, elle reproduit les signes de la rhinite atrophique. Cette toxine a été retrouvée chez des souches responsables d'infections pleuro-pulmonaires chez l'homme.

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES DE *P. MULTOCIDA*

A - Morphologie

Ce sont des coccobacilles à Gram négatif avec habituellement une coloration bipolaire. Parmi les corps bactériens de petite taille ($L = 1$ à $2 \mu\text{m}$; $1 = 0,3$ à $0,4$ (im)) des formes longues ($L = 3$ à $5 \mu\text{m}$) sont souvent observées. Les chaînettes sont très rares.

A l'état frais, les bactéries sont immobiles. L'encre de Chine permet de voir une capsule dont l'épaisseur varie avec le sérotype.

B - Caractères cultureux

La température de croissance est comprise entre 22 et 44°C avec un optimum à 37°C. Ce sont des bactéries aéro-anaérobies avec en gélose profonde une petite inhibition à la surface et un renforcement de la croissance en microaérophilie.

Sur milieux riches (gélose au sérum, gélose au sang) après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies sont petites (1 à 2 mm de diamètre) rondes, grisâtres, en gouttes de rosée. Parfois, l'importance de la capsule leur donne un aspect muqueux. En bouillon, un trouble homogène est obtenu en 24 heures.

Il n'y a pas de croissance sur les milieux suivants : Mac Conkey, milieu de Drigalski, milieu au citrate de Simmons et eau de levure.

C - Caractères biochimiques.

- L'oxydase est toujours positive si sa recherche est faite à l'aide de tétraméthyl-p-phénylènediamine.
- La catalase, la nitrate-réductase, l'ODC et l'indole sont constamment positives.
- Les caractères suivants sont négatifs : gélatinase, LDC, ADH, uréase et H₂S.
- Toutes les souches sont sensibles au composé vibriostatique 0/129.
- La fermentation du glucose se fait toujours sans production de gaz. Les glucides suivants sont régulièrement attaqués : mannitol, galactose, fructose, mannose, saccharose. Par contre, sont régulièrement négatifs : sorbose, rhamnose, inositol, adonitol.

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

Sous-espèces	Fermentation	
	Sorbitol	Dulcitol
<i>multocida</i>	+	
<i>septica</i>		
<i>gallicida</i>	+	+

D - Caractères antigéniques

Les polyosides constituant la capsule permettent, en fonction de leur composition, de distinguer classiquement 4 types capsulaires : A, B, D, et E. Un cinquième type capsulaire F, a été décrit pour des souches isolées chez la dinde.

Les lipopolyosides de paroi, possédant les caractères des endotoxines des bacilles à Gram négatif, permettent de classer les souches en 12 sérotypes.

Une sérotypie capsulaire et somatique existe donc, mais elle n'est pas utilisée en pratique courante en raison de la complexité de cette détermination.

E - Pouvoir pathogène expérimental

La souris inoculée par voie péritonéale meurt rapidement d'une septicémie. Cette aptitude à tuer la souris peut être perdue par des souches qui sont dépourvues de capsule.

VI - AUTRES ESPÈCES DU GENRE *PASTEURELLA*

Les caractères différentiels de *P. multocida* avec *P. canis* et *P. dagmatis* sont montrés dans le tableau I. Ces deux espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme voisin de celui de *P. multocida*.

CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES *PASTEURELLA*

Taxon	Omithine	Indole	Uréase	Acidification en 24 à 48 h de				
				Tréhalose	Maltose	Xylose	Arabinose	Mannitol
<i>P. multocida</i>	+ ^c	+	-	d	-	d	-	+
<i>P. canis</i>	+	d	-	d	-	d	-	-
<i>P. dagmatis</i>	-	+	+	+	+	-	-	-
« <i>P.</i> » <i>haemolytica</i> ^{1'}	- ^c	-	-	d	+	d	-	d
« <i>P.</i> » <i>pneumotropica</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
« <i>P.</i> » <i>aerogenes</i> [*]	+ ^c	-	+	-	+	d	+	-
« <i>P.</i> » <i>ureae</i>	~	~	+	-	+	-	-	+

a+ : > 90% des souches sont positives ; - : S 90% des souches sont négatives ;
d : différents résultats obtenus.

b : production d'une hémolyse p, variable selon les souches.

c : espèces se développant sur gélose de Mac Conkey.

* : production de gaz abondante en milieu glucose.

Les quatre autres espèces désignées dans ce tableau par « P » ne sont pas des *Pasteurella stricto sensu* et sont dans l'attente d'une position taxonomique plus précise. « *P.* » *haemolytica* est souvent pathogène pour les animaux d'élevage : bovins, porcs, volailles. Comme « *P.* » *pneumotropica*, elle se développe sur gélose de Mac Conkey.

VII - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE INFECTION A *P. MULTOCIDA*

A - Isolement de *P. multocida*

Il se fait le plus souvent à partir de sérosités recueillies profondément dans les lésions de morsures. Classiquement il y a une auto-stérilisation rapide des lésions ; il est cependant souvent possible de retrouver *P. multocida* dans les morsures après plusieurs jours.

Dans les autres produits pathologiques l'isolement de *P. multocida* est souvent fortuit (sécrétions bronchiques). Un milieu sélectif contenant 2 mg/1 d'amikacine et 4 mg/1 de vancomycine peut être utile pour les prélèvements pluri-microbiens.

B - Diagnostic indirect

La recherche d'anticorps sériques n'a pas d'intérêt pratique.

Le diagnostic indirect, utile dans les formes chroniques où il n'y a plus de bactéries dans les lésions, se fait par l'**intradermoréaction à la pasteurelline de Reilly**.

Une réaction allergique d'hypersensibilité retardée apparaît 10 à 20 jours après l'inoculation de *Pasteurella multocida*. L'antigène utilisé ou pasteurelline est un filtrat d'une culture en bouillon de *P. multocida*. L'injection intradermique est effectuée avec 0,5 ml de pasteurelline.

La lecture doit être relativement précoce, car la réaction commence à la 6^e heure, est maximale à la 12^e heure et décroît à la 24^e heure. La réaction locale (placard érythémateux) doit mesurer au moins 3 cm pour être significative. Elle s'accompagne

souvent d'une réaction focale : sensibilité de la **zone** d'inoculation, douleur articulaire, poussée thermique.

L'hypersensibilité retardée à la pasteurelline persiste des années. Elle est toujours nette dans les formes algodystrophiques chroniques. Elle peut être négative si le malade reçoit des corticoïdes ou d'autres anti-inflammatoires.

VIII - TRAITEMENT D'UNE PASTEURELLOSE

A - Les antibiotiques

Les souches de *P. multocida* isolées chez l'homme sont généralement sensibles aux tétracyclines, à la pénicilline G et à l'ampicilline qui sont les antibiotiques de choix pour les pasteurelloses d'inoculation. Les souches d'origine bovine sont moins sensibles et peuvent résister à la pénicilline en produisant une bêta-lactamase de type ROB-1. Les souches isolées chez l'homme qui produisent une bêta-lactamase sont encore rares.

Les aminosides sont peu actifs et ne doivent pas être utilisés seuls pour traiter une infection à *P. multocida*.

B - Antigénothérapie

Dans les formes chroniques algodystrophiques, les antibiotiques sont inefficaces. Une amélioration peut être obtenue par 4 ou 5 injections intradermiques de pasteurelline séparées d'une semaine chacune.

BIBLIOGRAPHIE

- AVRIL J.L., DONNIO P.Y., POUEDRAS P., Sélective médium for *Pasteurella multocida* and its use to detect oropharyngeal carriage in pig breeders *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 1438-1440.
- BURDIN J. C., LION C., « Diagnostic biologique des infections à *Pasteurella* » in *Les Pasteurelles et leur pathologie*. Numéro spécial de la revue *Médecine et Maladies Infectieuses*, mars 1986.
- DONNIO P. Y., AVRIL J.-L., ANDRE P.-M., VAUCEL J.-H., Dermonecrotic toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from man, *J. Med. Microbiol.*, 1991, 34, 333-337
- KILIAN M., FREDERIKSEN W., BIBERSTEIN EL, *Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus*, Académie Press., London, 1981.
- MUTTERS R., PIECHULLA K., MANNHEIM W., « Phenotypic differentiation of *Pasteurella* stricto sensu and the *Actinobacillus* group », *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1984, 3, 225-229.
- SCHEFTEL J.M. *et al.*, « Infection d'une plaie par *Pasteurella aerogenes* chez un chasseur après blessure due à une charge de sanglier », *Méd Mal Infect*, 1987, 5, 267-268.
- WEBER D.J., WOLFSON J.S., SWAETZ M.N *et al.*, « *Pasteurella multocida* infections, report of 34 cases and review of the literature », *Medicine*, 1984, 63, 133-154.

ANNEXE 1

AUTRES BACTÉRIES DES MORSURES

Les bactéries citées ici sont présentes dans la flore buccale des animaux et peuvent être trouvées dans des plaies ou lors de septicémies consécutives à des morsures. Ce sont des petits bacilles à Gram négatif, immobiles, donnant des colonies petites qui se développent lentement sur gélose au sang ou gélose chocolat incubées dans une atmosphère enrichie en CO₂.

N'étant pas encore classés de façon précise, ces bacilles sont désignés par le CDC d'Atlanta comme : Groupe EF 4 (eugonic fermenter) ; Groupe M 5 ; Groupe II ; (apparenté aux *Flavobacterium*) et Groupe DF 2 (dysgonic fermenter, aujourd'hui classée comme *Capnocytophaga canimorsus*). Les caractères permettant de les distinguer de *P. multocida* sont présentés dans le tableau ci-dessous.

ANNEXE II

STREPTOBACILLUS MONILIFORMIS

Cette bactérie n'a aucune parenté taxonomique avec les *Pasteurella*. C'est parce que l'infection est généralement consécutive à une morsure que nous la situons ici.

1 - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

Bacille à Gram négatif, formant des filaments longs et flexueux, mais donnant aussi des formes coccobacillaires. Dans les cultures âgées de quelques jours la coloration de Gram peut être positive.

La culture se fait en aéro-anaérobiose, elle est favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂. Ce germe nécessite du sang, du sérum ou de l'ascite. Les colonies se développent en 2 à 5 jours.

Le sodium polyéthanol sulfate (S.P.S), anticoagulant utilisé dans les flacons d'hémoculture, a un effet inhibiteur. Il faut en cas de suspicion d'infection à *S. moniliformis* utiliser des flacons d'hémoculture contenant du citrate comme anticoagulant.

II - HABITAT

Commensal de la cavité buccale des rongeurs.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

- Septicémie survenant 3 à 5 jours après une morsure de rat. Les épanchements articulaires sont fréquents et permettent l'isolement du germe. Ces septicémies peuvent se compliquer d'endocardites, de péricardites, d'abcès cérébraux.
- Les déjections de rongeurs peuvent être contaminantes et des infections non précédées de morsure ont été décrites.

IV - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

S. moniliformis est sensible à la plupart des antibiotiques y compris la pénicilline G à laquelle ce germe est très sensible.

BIBLIOGRAPHIE

- DELLAMONICA P., DELBEKE E., GIRAUD D., ILLY G., « Septicémies à *Streptobacillus moniliformis* : à propos d'un cas, revue de la littérature », *Méd. Mal. Infect.*, 1979, 9, 224-229.
- KUNNERT J.E., CHRISTMANN D., PIEMONT Y., MONTEIL H., STORCK D., « Fièvres après morsure de rat : à propos d'un cas de streptobacillose », *Sem. Hop. Paris*, 1985, 61, 2379-2381.

CARACTÈRES PHÉNOTYPIQUES DES BACILLES À GRAM NÉGATIF ISOLES DE MORSURES

Caractères communs

Bacilles à Gram négatif, immobiles, oxydase positive, catalase positive, se développant sur gélose au sang en donnant des petites colonies, ne se développant pas ou mal sur gélose de Mac Conkey. La LDC est négative.

	Caractères différentiels				
	<i>P. multocida</i>	EF-4	DF-2*	M5	Ilj
Croissance sur Mac Conkey		d		d	
Attaque du glucose par voie fennentadve	+	+	+		
Réduction des nitrates	+	+			
Production d'indole	+				+
Uréase					+
Géladnasc		d			+
ODC	+				
ADH		+	d		
Production possible d'un pigment		+		+	

* DF-2 est aujourd'hui rattaché au genre *Capnocytophaga* sous le nom de *C. canimorsus*.

ANNEXE III

MALADIE DES GRIFFES DU CHAT

Le bacille de la maladie des griffes du chat a été décrit en 1988 et classé dans le genre *Afipia* (du sigle AFIP pour Armed Forces Institute of Pathology de Washington DC, USA où la première souche a été isolée). Il s'agit de bacilles à Gram négatif, oxydase positive, mobiles, cultivant sur gélose BCYE (voir *Legionella*) et en bouillon nutritif à 25 et 30°C, mais pas sur Mac Conkey. Les colonies sont grisâtres, brillantes, convexes, à bords nets. Le caractère uréase est positif, mais l'hémolyse, la production d'indole, de SH₂, l'hydrolyse de la gélatine et de l'esculine sont négatifs; il n'y a pas d'oxydation du glucose, lactose, maltose et saccharose.

L'espèce *Afipia felis* est responsable de la maladie des griffes du chat et a été isolée d'un ganglion de sujet atteint. *A. felis* est résistant à de nombreux antibiotiques et est sensible aux aminoglycosides, à l'imipénème et au ceftriaxone. Les autres espèces du genre, *A. clevelandensis*, *A. broomae* et *A. genospecies 1,2 et 3* ne sont pas associées avec la maladie des griffes du chat et ont été isolés de plaies, crachat, liquide synovial, liquide pleural, liquide de lavage bronchique et de l'eau.

BIBLIOGRAPHIE

BRENNER D.-J., *et al.*. Proposals of *Afipia* gen. nov., with *Afipia felis* sp. nov. (formerly the cat scratch disease bacillus), *Afipia clevelandensis* sp. nov. (formerly the Cleveland Clinic Foundation strain), *Afipia broomae* sp. nov. and three unnamed genospecies, J. Clin. Microbiol., 1991, **29**, 2450-2460.

Chapitre XX

HAEMOPHILUS

HISTORIQUE

Au cours de la pandémie de grippe de 1889-1892, Pfeiffer a observé et cultivé à partir de crachats de grippés un petit bacille, *Bacillus influenzae* et en a fait l'agent étiologique de la « grippe » ou « influenza » ; il a montré la présence indispensable de sang pour la culture de cette bactérie et invente la gélose au sang.

Quelques années plus tôt, en 1883 en Egypte par Koch, en 1886 aux U.S.A. par Weeks, avait été observée, puis cultivée dans l'exsudat de conjonctivites purulentes une bactérie, bacille de Koch-Weeks, signalée dans un traité de 1889 sous le nom de *Bacillus aegyptius*.

Le nom du genre *Haemophilus* a été proposé en 1917. En 1939, A.L.woff propose le démembrement des « *Hemophilae* » et la création du genre *Moraxella*, suivi en 1952 par Moreno-Lopez qui propose le genre *Bordetella*.

Jusqu'en 1933, date de la découverte de l'agent étiologique de la grippe, *H. influenzae* était resté, parfois avec des doutes, la bactérie suspectée d'être responsable de l'influenza. En 1930 Miss M. Pittman met en évidence l'existence de souches capsulées, propose des types sérologiques et **montre la prédominance du type b dans** les méningites et autres infections aiguës suppurees.

HAEMOPHILUS INFLUENZAE

I - CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU GENRE

Les caractères généraux des bactéries du genre *Haemophilus* sont les suivants : petits bacilles ou coccobacilles à Gram négatif avec un polymorphisme très accentué (formes allongées) ; immobiles, non sporulés, parfois capsulés, aérobies et anaérobies facultatifs, **exigeant des facteurs présents dans le sang**, le facteur X ou protoporphyrine IX ou protohème et/ou le facteur V (NAD ou NADP), dont la croissance est aussi favorisée par les milieux complexes, à la température optimale de 35-37°C ; possédant une nitrate-réductase, présentant une réaction de la catalase et de l'oxydase variables ; utilisant les hydrates de carbone par un processus fermentatif ; étant des **parasites obligatoires des muqueuses** de l'homme et des animaux ; le G + C % de l'ADN est compris entre 37 et 44 moles.

II - TAXONOMIE ET NOMENCLATURE

Le genre *Haemophilus* est placé (Kilian, Bergey's Manual 1984) dans la famille des *Pasteurellaceae* avec les genres *Pasteurella* et *Actinobacillus*.

Haemophilus influenzae est l'espèce-type du genre qui contient seize espèces d'origine animale et humaine.

Parmi les seize espèces décrites, 3 exigent les facteurs X et V (*H. influenzae*, *H. aegyptius* et *H. haemolyticus*), 2 n'exigent que le facteur X (*H. haemoglobinophilus* et *H. ducreyi*) et 10 n'exigent que le facteur V (*H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pleuropneumoniae*, *H. paracuniculus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *H. parasuis*, *H. paragallinarum*, *H. aviwn*). *H. aphrophilus* présente une exigence en facteur X variable.

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Haemophilus* font partie de la flore normale des muqueuses des voies respiratoires supérieures et de la cavité buccale de l'homme ; ils peuvent aussi être isolés dans le tube digestif et au niveau de la muqueuse vaginale.

Deux espèces, *H. aegyptius* et *H. ducreyi* ne sont pas rencontrées chez le sujet sain. Par contre *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus* et *H. segnis* occupent une place variable dans les différentes niches écologiques.

Les *Haemophilus* représentent 11 % de la flore pharyngée d'un sujet normal ; l'espèce dominante est *H. parainfluenzae*, *H. influenzae* est présent en moins grande quantité et est plus fréquent chez l'enfant. Le portage d'*H. influenzae* concerne 75 % des jeunes enfants et 35 % des adultes et des enfants âgés, mais il existe de grandes variations dans la colonisation pharyngée par les souches capsulées de type b. Dans une population normale les souches capsulées sont rencontrées chez moins de 5 % des enfants (la moitié des souches étant de type b) ; chez les adultes, le portage est habituellement inférieur à 0,50 %.

H. influenzae est plus rarement rencontré au niveau de la muqueuse buccale, de la salive et à la surface de la muqueuse vaginale. *H. haemolyticus* est localisé au niveau du pharynx.

H. parainfluenzae est plus ubiquitaire et colonise les muqueuses buccales et pharyngées ; il est aussi présent dans les selles et la cavité vaginale. Dans la salive, *H. parainfluenzae* peut être en quantité importante (1.10⁷ bactéries par ml). Les autres espèces, le plus souvent V dépendantes, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. segnis*, *H. paraphrophilus* ont les mêmes préférences écologiques (muqueuses buccales et pharyngées), mais sont moins fréquentes. Dans la bouche, la surface des dents (plaque dentaire, espace dentaire, poche gingivale) est le site préférentiel pour *H. parainfluenzae*, *H. segnis*, *H. paraphrophilus* et *H. aphrophilus*.

H. influenzae de type b est l'une des trois principales espèces bactériennes responsables des méningites primitives. Il occupe dans notre pays la deuxième place derrière le méningocoque. Aux Etats-Unis d'Amérique, il occupe la première place et le risque pour un enfant de présenter une méningite à *H. influenzae* pendant les cinq premières années de sa vie est estimé à 1/500. Ce risque est de 1/1 500 en Grande Bretagne. La maladie atteint des enfants âgés de 2 mois à 3 ans avec une incidence maximale entre 6 mois et 1 an. Les souches sont le plus souvent de biotype I.

La méningite à *H. influenzae* est une infection sporadique et il n'y a pas de vraies épidémies comme celles observées avec le méningocoque. Cependant des études récentes ont montré que la méningite à *Haemophilus* doit être considérée comme contagieuse, avec un risque équivalent à celui de la méningite cérébrospinale. Lors de manifestation invasive dans une collectivité ou une famille, il y a toujours une augmentation importante du nombre de porteurs de souches capsulées. Les autres

manifestations invasives ont une distribution, selon l'âge, identique à celle des méningites à l'exception des épiglottites moins fréquentes qui touchent les enfants plus âgés, de 2 à 7 ans.

La dissémination des souches capsulées se fait par les gouttelettes dispersées lors de la respiration ou par contact direct, intime, avec les sécrétions d'un malade ou d'un porteur ; la bactérie ne survit pas à la dessiccation dans le milieu extérieur.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

H. influenzae est une bactérie pyogène responsable d'infections variées parfois sévères observées à tous les âges de la vie mais plus fréquemment chez l'enfant. Il s'agit soit d'infections aiguës systémiques provoquées par des souches invasives **capsulées de type b** soit d'infections aiguës sans bactérienne ou chroniques provoquées par des souches non capsulées dans lesquelles *H. influenzae* ne joue parfois qu'un rôle secondaire.

A - Chez l'enfant

Les infections à *H. influenzae* sont rares dans la période néonatale ; il en est de même des infections puerpérales reconnues cependant depuis le début du siècle. Les souches responsables sont le plus souvent non capsulées. La localisation méningée est exceptionnelle à cet âge.

Après l'âge de deux mois les manifestations invasives sont les plus fréquentes et les plus graves.

Les méningites à *H. influenzae* sont fréquentes chez l'enfant âgé de 3 mois à 3 ans. La forme classique est habituellement précédée de signes d'infection des voies respiratoires supérieures (pharyngite, sinusite ou otite moyenne) contemporaine ou non d'une infection virale. Il existe plus rarement des formes foudroyantes. La mortalité est inférieure à 10 % mais les séquelles neurologiques ne sont pas rares, observées dans 20 à 30 % des cas. Le risque de complications et de séquelles est d'autant plus élevé que la concentration bactérienne (ou en antigènes solubles) dans le LCR est importante et durable. La bactérie responsable est *H. influenzae* de type b.

L'épiglottite qui survient chez des enfants plus âgés (de 2 à 7 ans) est moins fréquente que la méningite.

D'autres localisations sont observées avec une fréquence variable lors d'infection systémique : arthrite (et plus rarement ostéite ou ostéomyélite), otite moyenne, cellulite, péricardite, pneumonie avec ou sans empyème, orchite-épididymite. Chez l'enfant plus âgé les infections à *H. influenzae* peuvent survenir lors de déficience du terrain, déficit immunitaire, leucémie, cancer.

L'otite moyenne à *H. influenzae* est le plus souvent une infection localisée, sans bactériémie et les souches sont non capsulées dans 80 % des cas. Il en est de même des autres infections de la sphère ORL et des infections bronchopulmonaires.

La conjonctivite à *H. influenzae* se manifeste sous deux formes : cas sporadiques provoqués par des souches capsulées ou non et épidémies localisées dans des pays à climat chaud (Afrique du Nord, sud des U.S.A.) habituellement provoquées par le bacille de Koch-Weeks, *H. aegyptius*, non capsulé proche de *H. influenzae* de biotype III.

B - Chez l'adulte

Toutes les manifestations précédemment décrites chez l'enfant peuvent être observées chez l'adulte. **Le terrain** va jouer un rôle prédominant dans la survenue des

infections à *H. influenzae*. Les méningites à *H. influenzae* représentent de 1 à 10 % des méningites purulentes de l'adulte. Elles sont observées plus volontiers chez le sujet âgé ou lors de causes favorisantes : traumatisme crânien, agammaglobulinémie, diabète, alcoolisme, splénectomie, autre maladie intercurrente. *H. influenzae* est rarement responsable de méningite récidivante (essentiellement à pneumocoque). Les souches sont le plus souvent non capsulées.

Les localisations pulmonaires et bronchopulmonaires sont les plus fréquentes. Il s'agit soit de pneumonie avec bactériémie, soit d'infection bronchopulmonaire lors de bronchite chronique. Dans ce cas, la perte des capacités de défense de la muqueuse bronchique permet la colonisation des bronches par les bactéries des voies respiratoires supérieures. L'exacerbation aiguë de la maladie chronique est accompagnée de la prolifération seul ou avec d'autres bactéries de *H. influenzae* le plus souvent non capsulé. *H. influenzae* joue avec le pneumocoque un rôle important dans les sinusites aiguës.

Par contre les infections avec bactériémie sont peu fréquentes chez l'adulte (épiglottite, péricardite, endocardite, arthrite, cellulite). Des infections biliaires, appendiculaires, urinaires, prostatiques, génitales et gynécologiques ont été décrites.

V - PHYSIOPATHOLOGIE ET FACTEUR DE VIRULENCE

Haemophilus influenzae élabore différents produits qui à des degrés divers participent au pouvoir pathogène de cette espèce. Toutes les souches d'*H. influenzae* (comme *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* et le gonocoque) produisent une enzyme, immunoglobuline A protéase, extracellulaire, spécifique des IgA humaines de la sous-classe des IgA₁. Le rôle des IgA₁ protéases n'est pas encore élucidé.

De découverte récente, les pili de *H. influenzae* jouent un rôle encore imparfaitement connu. Ils sont responsables de l'adhésion aux cellules épithéliales mais ne semblent pas jouer un rôle déterminant dans la colonisation des muqueuses et l'invasion.

Parmi les composants bactériens, le lipopolysaccharide et les protéines de membrane externe sont des constituants antigéniques importants pour les études épidémiologiques.

Les antigènes polysaccharidiques de capsule sont le support essentiel de la virulence lors de manifestations invasives. Les souches capsulées ont été classées par Miss Pittman en 6 sérotypes a, b, c, d, e, et f. Le sérotype b est le plus fréquent ; il est dû à un polyribosylribitol phosphate ou PRP, antigénique qui, purifié, est utilisé comme vaccin.

Les anticorps dirigés contre le PRP sont des anticorps protecteurs qui apparaissent progressivement chez l'enfant. Fothergill et Wright ont montré dès 1932 la relation existant entre l'absence d'activité bactéricide du sérum et l'incidence des méningites à *H. influenzae* de type b. Ultérieurement la même corrélation a été établie entre les anticorps anti PRP et la survenue des méningites, plus fréquentes entre 3 mois et 3 ans. La période située entre la fin de la protection passive conférée par les anticorps d'origine maternelle et l'acquisition d'anticorps à un titre suffisant est favorable au développement des méningites.

VI - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Les produits pathologiques

Ce sont soit des produits monomicrobiens obtenus par ponction (LCR, liquide articulaire, liquide pleural), soit des produits polymicrobiens comme les sécrétions bronchiques et les prélèvements dans la sphère ORL. Ces derniers doivent être réalisés en évitant ou limitant la contamination par la flore oropharyngée. La mise en culture des sécrétions bronchiques se fait après homogénéisation du prélèvement et est accompagnée d'une approche quantitative des bactéries présentes. L'hémoculture est utile dans tous les cas d'évolution fébrile. Il faudra penser à *H. influenzae* dans certaines circonstances inhabituelles et rares (urines, pus profond, ...)

B - Examen direct

Dans un produit pathologique ou dans une culture, *H. influenzae* se présente comme un petit bacille à Gram négatif (0,3-0,4 x 1-1,5 u,m) court, le plus souvent coccobacillaire. Mais il faut souligner la fréquence du polymorphisme qui lors de l'observation d'une préparation microscopique peut rendre perplexe un observateur non averti. Ce sont des bacilles immobiles, non sporulés et dans certains cas possédant une capsule.

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

C - Culture - Caractères d'identification

L'appartenance au genre *Haemophilus* repose sur l'exigence en facteur de croissance X et V présents dans les globules rouges.

Le facteur V, NADP, est une co-enzyme de déshydrogénase. NAD est thermolabile et inactivé par chauffage 30 mn à 120°C. Le facteur V est intraglobulaire, est présent dans les tissus et est synthétisé par la plupart des espèces bactériennes.

Le facteur X est l'hémine qui entre dans la composition des enzymes respiratoires contenant du fer (cytochromes, cytochrome oxydase, catalase, peroxydase). Ce composé est indispensable aux bactéries ne possédant pas les enzymes de la chaîne de transformation de l'acide delta amino-levulinique en protoporphyrine. En anaérobiose les besoins en facteurs X de *H. influenzae* sont très réduits ou même nuls. Le facteur X diffuse à partir des globules rouges intacts et est libéré après chauffage.

Les milieux de culture doivent contenir les facteurs X et V. La gélose au sang avec une strie de *S. aureus* qui réalise un apport de facteur V permet la culture par le phénomène de satellitisme. La **gélose au sang cuit** est obtenue par chauffage modéré entraînant la libération de X et V à partir des globules rouges. La gélose chocolat est un milieu nutritif complexe contenant de l'hémine auquel doit être ajouté le NAD.

Les milieux nutritifs habituels peuvent être supplémentés en facteur X et V (Fildes, NAD, hémine, extrait de levure).

La recherche d'*Haemophilus* dans les produits polymicrobiens provenant du tractus respiratoire utilise des milieux sélectifs préparés par addition d'antibiotique, bacitracine par exemple (ce fut la première utilisation de la pénicilline par Fleming en 1929).

La température optimale de culture est de 35-37°C. L'incubation en atmosphère humide favorise la croissance et certaines espèces exigent une atmosphère enrichie en CO₂ (*H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*).

Différents **types de colonies** ont été décrits chez *H. influenzae*. Les souches capsulées donnent des colonies muqueuses, volumineuses, ayant tendance à s'étaler ou des colonies lisses, rondes à bords réguliers, bombées, facilement dissociables, iridescentes sur milieu transparent en lumière oblique. Les souches non capsulées sont soit des colonies lisses, voisines des précédentes, plus petites, sans iridescence soit plus rarement de type rugueux, difficile à prélever, qui est l'aspect habituel des colonies d'*H. parainfluenzae*.

En milieu liquide les souches **S** donnent un trouble homogène, **les souches R** forment un dépôt granuleux sans modifier la limpidité du milieu.

Certaines souches d'*H. influenzae* émettent une odeur d'indole caractéristique.

D - Identification

La première étape de l'identification des *Haemophilus* est la mise en évidence de l'exigence en facteur X et/ou V. Différentes méthodes permettent d'explorer cette exigence : phénomène de satellitisme sur gélose au sang avec une strie de Staphylocoque, milieu complété avec l'un et/ou l'autre facteur, disques contenant l'un et/ou l'autre facteur déposés à la surface d'un milieu gélose. Tout apport parasite de facteur de croissance (en particulier X à partir de milieu au sang, flacon d'hémoculture,...) doit être soigneusement évité, de même qu'il est important pour réaliser ces tests d'utiliser des milieux nutritifs ne contenant aucune trace de ces facteurs. Le test explorant la synthèse de porphyrine à partir de l'acide delta-aminolévulinique permet d'apporter une certitude quant à la dépendance en facteur X (test de la porphyrine).

L'identification est complétée par l'étude de caractères biochimiques présentés dans les tableaux 1 et II. La fermentation du glucose, avec ou sans production de gaz est constante ; l'utilisation du xylose et du ribose par *H. influenzae* et celle du saccharose et du fructose par *H. parainfluenzae* sont de bons caractères différentiels. Seules les espèces exigeantes en facteur V seul et *H. aphrophilus* ont un test à l'ONPG positif.

En fonction de trois caractères biochimiques, ornithine-décarboxylase, uréase et production d'indole, Kilian a proposé des **biotypes** actuellement au nombre de 8 pour *H. influenzae* et de 3 pour *H. parainfluenzae*. Ces caractères peuvent être recherchés avec les milieux habituels supplémentés ou non ou à l'aide de microméthode (galerie API 10 E avec un inoculum lourd).

La détermination du **sérotyp** des souches capsulées est réalisée par agglutination sur lame, gonflement de la capsule, co-agglutination ou électrophorèse.

L'étude des besoins en facteurs X et/ou V est la première étape du diagnostic différentiel. L'exigence stricte en CO₂ est un autre élément du diagnostic différentiel. Les caractères biochimiques utiles pour différencier les espèces du genre *Haemophilus* et des bactéries voisines ou isolées dans des situations identiques sont présentés dans les tableaux 1 et II.

TABLEAU 1
CARACTÈRES BIOCHIMIQUES DES *HAEMOPHILUS* RENCONTRÉS CHEZ L'HOMME

	Synthèse porphyrines	Exigence facteur V	Hémolyse	Acidification D glucose	D fructose	Saccharose	Lactose	D-xylose
<i>H.influenzae</i>		+	-	+				+
<i>H.aegyptius</i>		+	-	(+)			-	
<i>H.haemolyticus</i>		+	+	+(g)	f			d
<i>H.parainfluenzae</i>	+	+		+(g)	+	+	-	-
<i>H.parahaemolyticus</i>	+	+	+	+(g)	+	+	-	
<i>H.paraphrohaemolyticus</i>	+	+	+	+	+	+	-	
<i>H.aphrophilus</i>	f			+(g)	+	+	+	
<i>H.paraphrophilus</i>	+	+		+(g)	+	+	+	
<i>H.segnis</i>	+	+		f	f	f	-	-

	D-ribose	D-mannose	D-galactose	Maltose	Mélibiose	Tréhalose	Raffinose	SH ₂
<i>H.influenzae</i>	+		+	+	-		-	
<i>H.aegyptius</i>	(+)		(+)	(+)			-	
<i>H.haemolyticus</i>	+		+	+	-			+
<i>H.parainfluenzae</i>		+	+	+	-			+
<i>H.parahaemolyticus</i>	-		d	+	-			+
<i>Hparaphrohaemolyticus</i>	-		d	+	-			+
<i>H.aphrophilus</i>	+	+	+	+	-	+	+	
<i>H.paraphrophilus</i>	+	+	-	+	+	+		+
<i>H.segnis</i>	-		f	f			-	

	Hémagglutinadon	Besoin CO ₂	Phosphatase alcaline
<i>H.influenzae</i>			+
<i>H.aegyptius</i>	d	-	+
<i>H.haemolyticus</i>	-	-	+
<i>H.parainfluenzae</i>	-	-	+
<i>H.parahaemolyticus</i>	-	-	+
<i>H.paraphrohaemolyticus</i>	-	+	+
<i>H.aphrophilus</i>	-	+	+
<i>H.paraphrophilus</i>	-	+	+
<i>H.segnis</i>	-	-	+

f = réaction positive faible ; g = avec production de gaz ;
 (+) = réaction positive tardive pour plus de 90% des souches ;
 d = réaction positive pour 10 à 90% des souches.

TABLEAU n
BIOTYPES DE *H. INFLUENZAE* ET *PARAINFLUENZAE*
ET CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS AVEC DES ESPÈCES VOISINES

	Omithine décarboxylase	Urée	Indole	ONPG	Oxydase	Catalase	Réduction des nitrites
<i>H. influenzae</i>							
Biotype I	+	+	+	-	+	+	+
n		+	+	-	+	+	+
m	-	+		-	+	+	+
IV	+	+		-	+	+	+
V	+		+		+	+	+
VI	+	-		-	+	+	+
VII	-		+	-	+	+	+
VIII	-	-		-	+	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>							
Biotype I	+	-		+	+	d	+
II	+	+		d	+	d	+
m	-	+		d	+	+	+
<i>H. aegyptius</i>	-	+		-	+	+	+
<i>H. haemolyticus</i>		+	d		+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	d	+		d	+	d	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+		d	+	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-		+	+	-	+
<i>H. paraphrophilus</i>	-	-		+	+	-	+
<i>H. segnis</i>	-	-		d	-	d	+
<i>A. actinmycetemcomitans</i>	-	-		-	+	+	+
<i>Eikenella corrodens</i>	+	-		-	+	-	+
<i>Cardiobacterium huminis</i>	-		+	-	+	-	-

E - Classification : biotypes, sérotypes

Différents marqueurs peuvent être utilisés pour caractériser les souches d'*H. influenzae*. La répartition des biotypes est différente selon l'origine des souches : les souches invasives capsulées appartiennent le plus souvent au biotype I, les souches présentes au niveau des muqueuses des voies respiratoires supérieures sont de biotype II.

Parmi les six sérotypes définis par M. Pittman, le **sérototype b** est pratiquement toujours celui isolé lors de manifestations invasives. D'autres marqueurs comme les sous-types définis par le profil électrophorétique des protéines de membrane externe ou du LPS permettent de compléter les études épidémiologiques.

F - Diagnostic rapide

Le diagnostic rapide repose sur la recherche d'antigènes polysaccharidiques (antigènes solubles) dans les liquides biologiques, LCR, sérum, urines. Cette recherche peut se faire par différentes techniques, électrophorèse, agglutination de particules de latex revêtues d'anticorps, co-agglutination, ELISA. Elle concerne uniquement le type b d'*H. influenzae* et les indications sont les infections systémiques de l'enfant.

VIII – AUTRES ESPÈCES D'*HAEMOPHILUS*

Les caractéristiques biochimiques des autres espèces d'*Haemophilus* sont présentés dans les tableau 1 et II.

- *H. aegyptius* (bacille de Koch-Weeks) - Cette espèce doit être considérée comme une variété hémagglutinante de *H. influenzae* biotype III, mais tous les biotypes III ne sont pas *H. aegyptius*. Cette bactérie est responsable de conjonctivites en

pays chauds. En 1984 est survenue au Brésil, chez des enfants, une épidémie de purpuras fulminants pouvant être mortels et consécutifs à une conjonctivite purulente. La conjonctivite et la maladie grave connue sous le nom de "Fièvre Purpurique Brésilienne" sont dues à *H. aegyptius*.

H. parainfluenzae. Rarement responsable d'infections, essentiellement chez l'adulte, cette espèce a été isolée lors d'endocardite. Les cas de méningites et d'infections systémiques sont rares.

H. haemolyticus, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*. Ces espèces ont été isolées dans de très rares cas d'endocardite et d'abcès du foie.

H. aphrophilus et *H. paraphrophilus*. Ces deux espèces sont responsables d'endocardites (plus fréquemment que *H. parainfluenzae*) et d'abcès du cerveau.

IX - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

A - Sensibilité aux antibiotiques et traitement

Les différentes espèces sont habituellement résistantes aux lincosamines (caractère pouvant être utilisé comme aide au diagnostic) et peu sensibles *in vitro* aux macrolides.

H. influenzae est sensible aux principales familles d'antibiotiques : pénicillines (ampicilline), céphalosporines (I^e, II^e et surtout III^e génération), aminoglycosides, chloramphénicol, tétracyclines, triméthoprim, sulfamides, rifampicine et quinolones. Dans les années 1970 a été observée l'émergence des souches résistantes en particulier à l'ampicilline par production d'une **bêta-lactamase** plasmidique de type TEM (identique à celle observée chez *E. coli* et de nombreuses espèces d'entérobactéries, inhibée par l'acide clavulanique). Cette résistance n'est pas toujours décelée par l'antibiogramme standard (diffusion en gélose) et il est indispensable de rechercher, spécifiquement par une technique appropriée, la production de bêta-lactamase pour toutes les souches isolées en situation pathogène (par utilisation d'une céphalosporine chromogène, ou par méthode acidimétrique ou microbiologique). Plus rarement, la résistance est due à une enzyme de type ROB-1. Elle est parfois due à une modification de la perméabilité de la paroi bactérienne.

La résistance à l'ampicilline concerne 12 à 20 % des souches isolées dans notre pays. La résistance au chloramphénicol est plus rare (3 %) par production d'une chloramphénicol-acétyl-transférase d'origine plasmidique. La résistance concerne aussi les tétracyclines, la kanamycine et le triméthoprim. Il existe des souches invasives multirésistantes à ampicilline et chloramphénicol.

H. parainfluenzae a la même sensibilité que *H. influenzae* **mais les souches** résistantes, en particulier à l'ampicilline sont plus fréquentes.

Le traitement fait appel à différents antibiotiques actifs. L'ampicilline est l'antibiotique de choix dans le traitement des méningites administrée à forte dose par voie parentérale. L'émergence des souches résistantes à l'ampicilline a fait modifier les schémas thérapeutiques et abandonner l'ampicilline pour le chloramphénicol ou plus fréquemment une céphalosporine de troisième génération à bonne diffusion méningée.

B - Prophylaxie

Elle est concevable contre les infections à *H. influenzae* de type b avec pour objectifs l'élimination du portage chez l'individu isolé ou dans une collectivité et l'augmentation des défenses de l'organisme par la vaccination des sujets réceptifs. Ces deux objectifs ont fait l'objet de travaux nombreux, mais des incertitudes demeurent quant à leur opportunité et leur efficacité.

La chimioprophylaxie, non utilisée dans notre pays, peut faire appel à la rifampicine par voie orale. La vaccination repose sur l'utilisation du polysaccharide de type b ou polyribosylribitol (PRP) obtenu purifié. La réponse après vaccination est étroitement dépendante de l'âge et la synthèse d'anticorps antipolysaccharidiques est faible avant 18 mois. Les améliorations visent à mettre au point un vaccin, utilisable et efficace avant 18 mois, par couplage du PRP avec des protéines par exemple des anatoxines diphtériques ou tétaniques ou des protéines membranaires de *Neisseria meningitidis*.

BIBLIOGRAPHIE

BRENNER, D.J., MAYER L.W., CARLONE G.M. *et al.*, « Biochemical, genetic and epidemiologic characterization of *Haemophilus influenzae* biogroup Aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian Purpuric Fever. » *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 1524-1534.

DABERNATH H., « Méthodes rapides de détection de la résistance enzymatique à l'ampicilline et au chloramphénicol chez *Haemophilus influenzae* », *Path. Biol.* 1983, **31**, 103-106.

ESKOLA J., PELTOLA H., TAKALA A.K. *et al.*, « Efficacy of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-diphtheria toxoid conjugate vaccine in infancy. » *N. Engl. J. Med.*, 1987, 317, 717-722.

GRENIER B., MARCHAND S., « Méningites à *Haemophilus influenzae* chez l'enfant », *Med. Mal. Infect.*, 1982, **13**, 164-173.

GUTMANN L., WILLIAMSON R., COLLATZ E., ACAR J.F., « Mechanisms of beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1988, 7, 610-615.

« Rapport du colloque international organisé par le Groupe d'études épidémiologiques et prophylactiques sur l'infection à *Haemophilus* », *Path. Biol.*, 1983, **31**, n°2 numéro spécial.

HAEMOPHILUS DUCREYI

1 - POSITION TAXONOMIQUE

En 1889, Ducrey a décrit la bactérie responsable du chancre mou, connue actuellement sous le nom de *Haemophilus ducreyi*. Cette infection avait été individualisée de la syphilis en 1852, mais les difficultés de culture du bacille de Ducrey ont pendant longtemps fait reposer le diagnostic sur les seules données cliniques.

H. ducreyi constitue une espèce homogène et fait partie du genre *Haemophilus*. Cependant des études récentes d'hybridation ADN-ADN ont montré que cette espèce était éloignée des autres espèces du genre *Haemophilus*.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

H. ducreyi est une bactérie strictement adaptée à l'homme et n'a jamais été retrouvée dans le milieu extérieur. Elle est responsable du chancre mou, maladie sexuellement transmissible, endémique dans les régions tropicales et subtropicales d'Asie et d'Afrique. En Europe et en France, la maladie a disparu pendant plusieurs décennies ; elle était occasionnellement observée dans les ports.

L'infection est **observée à nouveau depuis les années 1970**. A côté de cas isolés, le chancre mou évolue sous forme d'épidémies dans des populations de travailleurs immigrés originaires d'Afrique le plus souvent. Dans la majorité des cas, l'infection

se produit au contact de prostituées. La transmission se fait par contact direct et nécessite une effraction cutanée. Il n'a pas été mis en évidence de porteurs sains (homme ou femme). La maladie est beaucoup plus fréquente chez l'homme.

Les infections à *H. ducreyi* sont dans de nombreux pays en voie de développement la principale cause d'ulcération génitale, plus fréquente que la syphilis. Dans les pays industrialisés la cause la plus fréquente en est l'infection à *Virus Herpès* suivie par l'infection à *Treponema pallidum*.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pouvoir pathogène naturel

Après une incubation de durée variable, courte, de moins d'une semaine, ou prolongée de 15 à 30 jours ou plus, la lésion débute par une pustule qui évolue sous forme d'ulcération douloureuse, non indurée, à bords surélevés et irréguliers, purulente. **Le chancre mou** est beaucoup plus fréquemment observé chez l'homme et siège le plus souvent sur la peau des organes génitaux (sillon balano-préputial, fourreau) plus rarement sur le gland. Il peut y avoir des ulcérations multiples résultant d'une auto-inoculation. Le chancre peut être accompagné d'une adénopathie satellite (bubon inguinal) évoluant vers la fistulisation après ramollissement. L'infection est beaucoup plus rarement observée chez la femme et les lésions sont localisées à la partie cutanée des organes génitaux.

B - Pouvoir pathogène expérimental

L'auto-inoculation dans la peau du malade à partir de sa propre lésion a été complètement abandonnée comme moyen de diagnostic. Chez l'animal le pouvoir pathogène expérimental a pu être recherché par voie intradermique chez le lapin. La virulence des souches est très variable et s'atténue au cours de la conservation.

IV - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produit pathologique

Le prélèvement est réalisé au niveau du chancre après déterision, à la base de l'ulcère avec un vaccinostyle ou un écouvillon ou par ponction au niveau du bubon inguinal. La conservation et le transport sont à éviter et le produit doit être mis en culture immédiatement.

B - Examen direct

L'examen microscopique du frottis se fait après coloration au bleu de méthylène ou au Giemsa. La coloration de Gram ne permet pas de visualiser correctement le bacille de Ducrey. La lecture peut être rendue difficile par la présence d'une flore associée. *H. ducreyi* se présente comme un bacille court (0,5 μm x 1,5-2 (im), à bouts arrondis, à coloration bipolaire intra et extra-cellulaire, évoquant une épingle de sûreté. Les bactéries peuvent être isolées ou groupées en chaîne (aspect en chaîne de bicyclette) ou en banc de poisson. L'examen direct est positif dans 50 à 80 % des cas.

C - Culture

H. ducreyi fait partie des bactéries de culture difficile ou « bactéries exigeantes ». De plus la présence fréquente d'autres bactéries dans le prélèvement nécessite l'utilisation de **milieux sélectifs**. Différents milieux solides ont été proposés, gélose au sang (humain, lapin, de foetus de bovidé), gélose chocolat et Isovitalex. L'enrichissement en hémine et en sérum (10 - 20 %) améliore le rendement des cultures. L'addition de vancomycine (3 mg/1) et de polymyxine (7,5 mg/1) réalise un milieu sélectif (VCN). Il est nécessaire d'utiliser deux milieux (sélectif et non sélectif) lors de l'isolement. Les meilleurs milieux de base sont la gélose Columbia, la gélose PPLO et le milieu GC pour gonocoque.

L'incubation est réalisée à 33-35°C en atmosphère de 5 à 10 % de CO₂ et saturée d'humidité.

Les colonies, visibles après 2 à 5 jours d'incubation, sont petites, semi-opaques, gris-jaunes, non muqueuses, qui, lors de la tentative de prélèvement, glissent intactes sur la gélose.

Le produit pathologique lors de la récolte peut être inoculé dans 1 ml de sérum (humain, lapin ou foetal de bovidé) et incubé à 35°C pendant 2-3 jours. Ceci réalise un **enrichissement** du bacille de Ducrey qui, après coloration, se présente sous forme de longues chaînes de bacilles à coloration bipolaire ayant l'aspect de chaîne de bicyclette.

D - Identification

L'espèce est pauvre en critères d'identification. *H. ducreyi* est une espèce exigeante en facteur X et ses besoins sont élevés (200 mg/1), supérieurs à ceux des autres *Haemophilus*. Le besoin en facteur X est difficile à explorer par le satellitisme autour d'un disque sur milieu déficient comme pour les autres *Haemophilus*, mais il peut l'être par le test à la porphyrine (recherche de synthèse de porphyrine à partir de l'acide delta aminolevulinique).

Les caractères habituels d'identification sont en majorité négatifs ; les principaux caractères positifs sont la réduction des nitrates en nitrites ; la présence d'une phosphatase-alcaline et le test à l'oxydase réalisé avec le tétra-méthyl-p-phénylènediamine. *H. ducreyi* possède des amino-peptidases mais pas de glycosidases.

Le profil électrophorétique des protéines de membrane externe permet de définir des sous-types utilisables pour les études épidémiologiques.

Le diagnostic repose donc sur l'aspect particulier du bacille, les exigences de culture et les caractères biochimiques négatifs.

Le diagnostic différentiel est à envisager pour des colonies à croissance lente comme certaines corynébactéries (à Grain positif).

V - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Le traitement fait appel à des soins locaux et une antibiothérapie par voie générale : les antibiotiques utilisés avec succès sont le triméthoprime - sulfaméthoxazole, la streptomycine, les tétracyclines, l'éthrythromycine.

Il existe des souches résistantes à l'ampicilline (par production d'une bêta-lactamase), à la tétracycline, au chloramphénicol, aux sulfamides, aux aminosides. Ces résistances sont d'origine plasmidique.

La prophylaxie est celle des maladies sexuellement transmissibles. Il n'existe **pas** d'immunité de surinfection.

BIBLIOGRAPHIE

ALBRITON W.L., « Biology of *Haemophilus ducreyi* », *Microbiol. Rev.*, 1989, 53, 377-389.

KRAUS S.J., KAUFMAN H.W., ALBRITTON W.L., THORNSBERRY C., BIDDLE J.W., « Chancroid therapy : a review of cases confirmed by culture », *Rev. Infect. Dis.*, 1982, **54**, S848-S856.

MOREL P., CASIN I., GANDIOL C., VALLET C., CIVATTE J., « Épidémie de chancre mou : traitement de 587 malades », *Nouv. Presse Med*, 1982, **11**, 655-656.

MORSE S.A., « Chancroid and *Haemophilus ducreyi* », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, 2, 137-157.

OBERHOFER T.R., BACK A.E., « Isolation and cultivation of *Haemophilus ducreyi* », *J. Clin. Microbiol.*, 1982,**15**, 625-629.

Chapitre XXI

BACILLES À GRAM NÉGATIF À CROISSANCE DIFFICILE

CARDIOBACTERIUM HOMINIS

HISTORIQUE

Slotnick et Dougherthy ont proposé en 1964 le nom de *C. hominis* pour désigner des bacilles à Gram négatif, polymorphes, de culture lente, placés initialement dans le groupe II-D (bactéries apparentées aux *Pasteurella*), responsables exclusivement d'endocardites. Il n'existe aucune parenté antigénique avec *Brucella*, *Streptobacillus*, *Pasteurella* et *Haemophilus*.

I - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

C. hominis fait partie de la flore normale des voies respiratoires supérieures et est présent dans le nez et le pharynx. Il est plus rarement présent au niveau du vagin. '

II - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Cette espèce bactérienne est responsable exclusivement d'endocardites.

C. hominis est une espèce peu virulente. L'endocardite survient lors de bactériémie à point de départ oro-pharyngé et greffe sur des lésions préexistantes.

III - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Le prélèvement est uniquement représenté par l'hémoculture qui est le seul moyen de diagnostic de l'endocardite à *C. hominis*. La culture positive est habituellement décelable après 1 à 7 jours d'incubation à 37°C (moyenne 4 jours) ; l'incubation doit être prolongée 2 à 3 semaines.

La culture se manifeste par un dépôt floconneux discret sans modification de la limpidité du milieu liquide.

IV - EXAMEN DIRECT - MORPHOLOGIE

C. hominis est un bacille droit, à extrémités arrondies, parfois renflées, de 0,5-0,7 x 1-3 μm , polymorphe, avec des formes longues de 10-20 μm ; les bactéries sont isolées, par paires, en courtes chaînes ou groupées en rosette, en paquets d'épingles.

C'est un bacille à Gram négatif (avec la particularité de retenir le colorant dans sa partie médiane ou à l'extrémité renflée), immobile, non capsulé, non sporulé.

V - CULTURE - CARACTÈRES D'IDENTIFICATION

C. hominis fait partie du groupe aéro-anaérobie facultatif ; certaines souches ont besoin de CO_2 (3 à 5 % de CO_2) à l'isolement.

En aérobiose, les souches ont besoin d'humidité. La croissance est obtenue à 30-37°C.

Les milieux doivent contenir de l'hémine, gélose au sang (lapin, mouton, cheval), gélose chocolat ; il n'y a pas de culture sur milieu ordinaire. En 48 heures, les colonies sont petites, 1-2 mm, lisses, circulaires, convexes, à bords nets, opaques, non hémolytiques.

Les bactéries possèdent un métabolisme fermentatif acidifiant **divers sucres** (glucose, fructose, saccharose...) sans production de gaz.

Les principales réactions biochimiques sont : oxydase (+), catalase (-), absence de réduction des nitrates en nitrites, ODC (-), urée (-), production d'indole en faible quantité recherchée après extraction par le xylène. Les éléments du diagnostic différentiel sont présentés dans le tableau.

CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES BACILLES À CROISSANCE DIFFICILE

Test	<i>Capniwcyto- phaga</i>	<i>Cardio- bacterium</i>	<i>Actino- bacillus</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Haemophilus aphrophilus</i>
Besoin en O_2	+	+	+	+	+
Oxydase	-	+	-	+	-/+
Catalase	-	-	+	-	-/+
Nitrate-réductase	V	-	+	+	+
Indole	-	+	-	-	-
Acidification					
- glucose	+	+	+	-	+
- lactose	V	-	-	-	+
- maltose	+	V	+	-	+
- mannitol	-	V	V	-	-
- saccharose	+	+	-	-	+

VI - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

C. hominis est sensible aux antibiotiques habituellement utilisés en association pour le traitement des endocardites. La prophylaxie est celle de l'endocardite bactérienne, en particulier une bonne hygiène bucco-dentaire.

CAPNOCYTOPHAGA

Le genre *Capnocytophaga* a été créé en 1979 et regroupe des bactéries initialement désignées comme *Bacteroides ochraceus* et groupe DF1.

Trois espèces, *C. ochracea*, *C. gingivalis* et *C. sputigena* appartiennent classiquement à ce genre : ce sont des bacilles fûsiformes à Gram négatif, cultivant en anaérobiose ou en aérobiose en présence de 5-10 % de CO₂ (d'où le nom : cellule qui mange du gaz carbonique), fermentant le glucose, donnant des colonies pigmentées en jaune-orange qui ont la particularité de s'étaler et de glisser à la surface de la gélose. La position taxonomique de ce genre n'est pas définitivement établie. Il est présenté ici en raison de ses similitudes d'habitat et de ses circonstances d'isolement. *C. canimorsus*, antérieurement désignée comme DF-2, a été rattachée au genre *Capnocytophaga*. *C. cynodegmi* désigne des souches qui en sont proches.

1 - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Ces bactéries font partie de la flore buccale et ont été isolées au niveau de la surface gingivale, de la poche périodentaire, du pharynx, de la salive.

C. canimorsus est un commensal de la cavité buccale du **chien et du chat**. L'infection humaine est généralement consécutive à une morsure.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

La reconnaissance de *Capnocytophaga* en tant que bactérie pathogène pour l'homme est récente. Elle a été isolée dans des circonstances particulières.

A - Pathologie dentaire

Bien que normalement présente au niveau de la bouche et de la poche périodentaire de sujets sains, *Capnocytophaga* semble responsable de certaines formes de périodontites.

B - Infections systémiques

Elles sont observées chez des patients atteints de maladie hématologique avec granulopénie. Elles ont aussi été observées chez des sujets ne présentant pas de modification des défenses.

C - Infections diverses

Isolée ou accompagnant des bactéries de la flore bucco-pharyngée, *Capnocytophaga* est responsable d'infections variées : empyème, sinusite, conjonctivite, ostéomyélite...

III - PHYSIOPATHOLOGIE . FACTEUR DE VIRULENCE

Chez le sujet immunodéprimé, les lésions buccales ou gengivales (gengivites, ulcérations), toujours présentes lors de septicémie, sont le point de départ de

l'infection. Dans les autres cas, la présence simultanée de bactéries de la flore bucco-pharyngée atteste de l'origine de l'infection par *Capnocytophaga*.

Des différences de virulence entre les espèces ont été observées dans les études expérimentales de la périodontite chez l'animal.

Le phénomène de glissement observé *in vitro* à la surface de la gélose pourrait jouer un rôle *in vivo* dans l'infection de la poche périodentaire. De plus une substance soluble d'origine bactérienne modifie l'activité des leucocytes.

IV - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produits pathologiques

Les produits pathologiques sont variés et les prélèvements réalisés selon les localisations de l'infection ; l'hémoculture reste le prélèvement le plus important.

B - Examen direct

Les bactéries du genre *Capnocytophaga* sont des bacilles fins, allongés (0,4-0,6 x 2,5-6 u.m), fusiformes, avec parfois une extrémité effilée et l'autre arrondie. Ces bacilles à Gram négatif sont non flagellés, non sporulés, non capsulés.

C - Caractères cultureux et d'identification

Capnocytophaga est un genre anaérobie facultatif qui pousse en anaérobiose, en aérobie en présence de 5-10 % de CO₂, mais pas en atmosphère ordinaire. La température doit être comprise entre 30 et 37°C. Les milieux de culture sont des milieux enrichis, gélose au sang (qui n'est pas indispensable), gélose chocolat, ou des milieux contenant des sucres. Certaines souches ont été isolées sur Milieu de Thayer et Martin.

Les colonies ont un aspect particulier dû à un étalement par glissement à la surface du milieu gélose. Ce phénomène de mobilité par glissement, qui conduit *Capnocytophaga* à entourer et entraîner des colonies déjà présentes sur le milieu est net sur gélose au sang de mouton en anaérobiose ; il est optimum avec un milieu à 3 % d'agar.

Les colonies sont plates, de 2-3 mm en 48 heures, les bords sont irréguliers et s'étalent dans plusieurs directions. Sur gélose au sang, les colonies ont une teinte rosé ou jaune ; la masse bactérienne est de couleur jaune après prélèvement par raclage.

Certaines souches ont des colonies qui creusent la gélose, d'autres qui adhèrent au milieu gélose.

En milieu liquide, bouillon nutritif contenant des sucres, la culture se traduit par un trouble homogène du milieu et une culture fine en grains ou en pellicule adhérente à la surface du verre.

Les caractères biochimiques sont : oxydase (-), catalase (-), fermentation du glucose et du saccharose, test à l'ONPG (+), indole (-), LDC (-), ODC (-). Les espèces se différencient par les fermentations sucrées et la réduction des nitrates.

V - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Les espèces du genre *Capnocytophaga* sont habituellement sensibles aux bêta-lactamines (pénicillines en particulier), tétracyclines, chloramphénicol, macrolides,

lincosamines, rifampicine et quinolones ; les aminoglycosides, la vancomycine, la colistine et le métronidazole sont inactifs.

EIKENELLA CORRODENS

E. corrodens, seule espèce du genre *Eikenella*, correspond à des petits bacilles à Gram négatif, de culture lente et difficile, favorisée par l'hémine et le CO₂, ne fermentant pas le glucose. Cette espèce, groupe HB-1 de King et Tatum, aéro-anaérobie facultative est séparée de *Bacteroides corrodens*, devenue *B. ureolyticus* anaérobie strict.

I - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

E. corrodens est présent au niveau des surfaces muqueuses, bouche, voies respiratoires supérieures, au niveau de la plaque dentaire et dans l'intestin.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

Une meilleure connaissance de cette espèce a permis son isolement dans de nombreuses situations pathogènes seule ou associée à d'autres espèces bactériennes.

A - Infections localisées

E. corrodens est responsable de la **formation d'abcès** en relation avec une contamination à partir des muqueuses. Parmi les principales localisations, il faut mentionner :

- les abcès du cerveau et l'empyème sous-dural lors de sinusite et d'abcès dentaire en association avec un streptocoque ;
- les infections pleuro-pulmonaires en association avec différentes bactéries ;
- les infections dentaires de type périodontite ;
- les infections cutanées après morsure, ou au niveau de la main lors de coup de poing dans la bouche, blessure par les dents et contamination par les bactéries de la cavité buccale, l'infection est localisée à la peau et au tissu sous-cutané, à l'articulation ou à l'os.

B - Bactériémies et endocardites

E. corrodens est responsable **d'endocardite**. Après avulsion dentaire, les bactériémies sont fréquentes mais habituellement sans manifestations ni conséquences cliniques.

III - PHYSIOPATHOLOGIE • FACTEURS DE VIRULENCE

E. corrodens est le plus souvent responsable d'infections d'évolution lente, indolentes. Les différentes localisations sont en rapport avec une contamination à partir des muqueuses après une lésion ou un traumatisme. Sa virulence est faible, aucune production de toxine n'a été mise en évidence et si dans certains cas

(endocardite, méningite, ostéomyélite) la bactérie est isolée seule, dans la majorité des cas d'abcès et de suppurations *E. corrodens* est associée avec une autre espèce bactérienne (streptocoque) et les deux espèces agissent en synergie.

IV - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produits pathologiques

E. corrodens peut être isolée de nombreux produits pathologiques : abcès, plaie, liquide articulaire, hémoculture, mais aussi expectoration, prélèvement pharyngé, buccal, gingival. La mise en culture est réalisée sur gélose au sang, ou chocolat **qui** peut être rendue sélective par addition de clindamycine.

B - Examen microscopique

La bactérie est un petit bacille (0,2-0,5 x 1-4 (J.m) à Gram négatif, coccobacillaire, à bords réguliers et extrémités arrondies, non capsulé, non sporulé, immobile, formant parfois des filaments.

C - Culture • Caractères d'identification

Aéro-anaérobie facultatif, *E. corrodens* a besoin d'hémine (25 mg/l) en aérobiose et une teneur de 5-10 % de CO₂ favorise la croissance. La culture est réalisée sur gélose au sang ou gélose chocolat à 37°C ; les colonies provoquent un verdissement de ces milieux. L'humidité est favorable à la culture. Après 18 heures d'incubation les colonies sont très petites (0,5 mm) et seront mieux visibles (1 mm) en prolongeant l'incubation. Il convient d'examiner soigneusement la surface des milieux lorsque une espèce à croissance rapide est présente. L'utilisation d'un milieu sélectif (clindamycine : 5 mg/l) facilite l'isolement à partir des prélèvements d'origine broncho-pulmonaire.

Un aspect caractéristique (partagé avec d'autres espèces comme *A. actinomycetemcomitans*, *Campylobacter*, *C. hominis*) est l'érosion, le creusement de la surface de la gélose. Ce phénomène, décelé par observation en lumière oblique n'est pas constant et une même souche peut avoir des variants sans érosion (colonies translucides, lisses, bombées) ; l'érosion est parfois mieux visible en enlevant les colonies.

Après 48 heures, la colonie typique de *E. corrodens* sur gélose au sang comprend trois zones : une zone centrale claire brillante, une zone circulaire perlée, mouchetée, très réfringente comme de multiples gouttelettes de mercure, une zone périphérique non réfringente de croissance active.

Selon les conditions d'observation, les colonies peuvent aussi ressembler à un œil de boeuf ou à une punaise incrustée dans la gélose, ou ne pas être vues car confondues avec des zones de dessiccation de liquide de condensation (parfois aspect en plus grand de colonies de *Campylobacter*).

Ces caractères sont moins nets sur gélose chocolat et varient selon les conditions d'incubation. Les colonies, bien qu'apparaissant grises ou translucides, possèdent un pigment jaune plus visible après incubation prolongée ou en réunissant plusieurs colonies.

En milieu liquide, bouillon glucose, thioglycolate, la culture de *E. corrodens* se manifeste par des formations granuleuses ou floconneuses adhérentes aux parois du tube, plus ou moins renforcée en zone microaérophile. Cette particularité est aussi fréquente avec *A. actinomycetemcomitans* et *H. aphrophilus*.

Les principaux caractères d'identification sont : oxydase (+), catalase (-), indole (-), réduction des nitrates en nitrites, LDC (+), ODC (+), uréase (-).

V - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

E. corrodens est sensible à de nombreux antibiotiques : pénicillines et céphalosporines (troisième génération), chloramphénicol, tétracyclines, rifampicine, mais il est résistant ou peu sensible aux céphalosporines de 1^e génération, à la méthicilline, aux aminoglycosides, à la lincomycine (et clindamycine) et au métronidazole.

ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS

Cette espèce a été décrite par Klinger en 1912 sous le nom de *Bacterium actinomycetemcomitans* après son isolement dans des lésions d'actinomycose (d'où son nom : qui accompagne un actinomycète). Elle fait partie du genre *Actinobacillus* aux côtés d'espèces pathogènes pour l'animal.

I - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

A. actinomycetemcomitans fait partie de la flore buccale normale et est présent au niveau de la plaque dentaire ; les infections par cette bactérie sont des infections endogènes, en général à point de départ bucco-dentaire.

II - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

A. actinomycetemcomitans a été isolé de lésion d'actinomycose associée avec *Actinomyces israelii* ; il semble capable de maintenir la persistance de lésions de type actinomycose en absence d'*Actinomyces*, mais ce rôle n'est pas parfaitement éclairci.

A. actinomycetemcomitans est responsable d'infections des tissus mous évoquant parfois une actinomycose, d'endocardites, d'abcès. Cette bactérie est aussi impliquée dans la pathologie bucco-dentaire, en particulier dans la périodontite de l'adulte et de l'enfant.

M - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Produits pathologiques

L'hémoculture est l'examen essentiel lors d'endocardite. La culture est décelable à partir du 3^e jour d'incubation et se manifeste sous forme de granules se déposant au fond du flacon, à la surface du sang sédimenté et adhérent à la paroi du flacon.

Les autres prélèvements sont fonction de la localisation (abcès du cerveau, abcès des tissus mous, joue, face avec *A. israelii*, otite, sinusite, broncho-pneumonie, abcès dentaire) mais l'isolement peut être difficile en raison de la flore associée.

B - Examen direct - morphologie

A. actinomycetemcomitans est une petite bactérie à Gram négatif, immobile, non sporulée, non capsulée, de forme coccoïde ou coccobacillaire. La forme bacillaire

peut être observée après plusieurs subcultures. Les bactéries sont isolées, par paires ou accolées, rarement en chaînes. La coloration peut être irrégulière.

C - Culture - Caractères d'identification

La culture est réalisée à 35-37°C en atmosphère enrichie en CO₂. Il n'y a pas d'exigence en X et V ; les milieux de culture sont la gélose au sang et la gélose chocolat.

Sur gélose, après 24 heures d'incubation, les colonies sont petites d'un diamètre de 0,5 mm mais atteignant 2-3 mm en 5-7 jours. Les colonies sont lisses, légèrement en dôme, translucides, avec une surface ridée. Après quelques jours d'incubation les colonies présentent un centre opaque et prennent l'aspect d'une étoile à 4 ou 6 branches laissant leur empreinte sur la gélose lorsque la colonie est enlevée.

Les colonies sont adhérentes à la surface du milieu et sont difficiles à prélever et à dissocier.

En milieu liquide, bouillon glucose, thioglycolate, la bactérie forme des granules qui adhèrent à la surface du tube, le liquide restant clair. Ces colonies sont difficiles à prélever et à dissocier.

Les principaux caractères biochimiques sont : oxydase (-) (sauf quelques souches), catalase (+), réduction des nitrates en nitrites, ODC (-), urée (-) (les autres espèces d'*Actinobacillus* possèdent une uréase), indole (-), fermentation du glucose mais pas du lactose et du saccharose.

D - Classification

Pulverer et Ko ont décrit huit biotypes basés sur la fermentation du xylose, du mannitol et du galactose.

E - Autres espèces d'*Actinobacillus*

A. lignieresii, *A. equuli*, *A. suis*, *A. capsulatus* sont des espèces rencontrées chez l'animal, normalement présentes dans l'appareil respiratoire, le tube digestif ou l'appareil génital et responsables d'affections variées chez diverses espèces animales.

F - Traitement

A. actinomycetemcomitans est sensible à l'ampicilline, à la tétracycline, au chloramphénicol...

CALYMMATOBACTERIUM GRANULOMATIS

Cette bactérie de culture très difficile est la seule espèce du genre *Calymmatobacterium*. Elle a été mise en évidence par Donovan en 1905 sous forme d'inclusion dans des cellules mononuclées présentes au niveau d'ulcères génitaux ou « granulome inguinal » (décrit en Inde en 1882).

1 - ÉPIDÉMIOLOGIE ET POUVOIR PATHOGÈNE

C. granulomatis est une bactérie pathogène uniquement pour l'homme. Son habitat est mal connu et l'épidémiologie de la maladie est mal comprise. Elle est responsable du « granulome inguinal », « Donovanose » ou « granulome ulcéreux des organes génitaux ». C'est une affection observée dans les pays à climat chaud et humide sur des sujets à peau colorée. Les localisations sont similaires à celles du chancre mou. Les lésions débutent par une papule ou un nodule qui évoluent en ulcérations chroniques, indurées, formées de tissus granulomateux hypertrophiques d'aspect velouté au niveau des muqueuses génitales, sans adénopathie. Les ulcérations persistent pendant des mois et les lésions s'étendent par voie lymphatique à la région inguinale. Il existe des localisations extra-génitales de cette affection qui, pour certains, ne serait pas uniquement une maladie sexuellement transmissible.

II - PHYSIOPATHOLOGIE

Les connaissances sur la physiopathologie et les facteurs de virulence de cette bactérie sont très limitées. Il existe une parenté morphologique et antigénique avec *Klebsiella*.

III - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Les produits pathologiques

Le prélèvement est réalisé au niveau de l'ulcération en tissu granulomateux par **biopsie** et empreintes.

B - Examen direct

La bactérie est un bacille immobile, polymorphe, capsulé, à Gram négatif, à coloration bipolaire. L'examen microscopique est le seul élément du diagnostic. Les empreintes et frottis tissulaires sont colorés par la coloration de Giemsa ou de Wright ; le bacille prend mal les autres colorants et n'est pas acido-résistant.

Les bactéries sont isolées ou en amas dans le cytoplasme de grandes cellules mononuclées, constituant les « **corps de Donovan** ». Le plus souvent polymorphes, certaines bactéries ont un aspect caractéristique en **épingle de sûreté fermée** (dû à la coloration bipolaire).

C - Culture

Les milieux ordinaires et les milieux enrichis habituels ne permettent pas la culture qui a été obtenue sur milieu contenant du jaune d'oeuf.

Il n'existe pas d'autres éléments bactériologiques que ceux réunis lors de l'examen microscopique et le diagnostic de la maladie repose sur l'aspect clinique des lésions.

IV - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

La bactérie est sensible à la tétracycline, au thiophénicol, à l'érythromycine, au co-trimoxazole, antibiotiques qui sont utilisés pour le traitement.

BIBLIOGRAPHIE

BRENNER D.J., HOLLIS D.G., FANNING G.R., WEAVER R.E., « *Capnocytophaga carnimorsus* sp. nov. (Formerly CDC group DF-2) a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* sp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite ». *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 231-235.

GRIGNON B., « *Capnocytophaga ochracea* : un germe des plaies et des abcès souvent méconnu », *Méd. Mal. Infect.*, 1986, **16**, 176-178.

RAVISSE P., « Rhinosclérome et donovanoses : affections apparentées », *Méd. Mal. Infect.*, 1985, **15**, 11 bis, 689-692.

SEDAILLAN A., « *Eikenella corrodens* : fréquence d'isolement et rôle pathogène », *Méd. Mal. Infect.*, 1986, **16**, 57-60.

SLOTS J., « Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* », *Arch. Microbiol.*, 1982, **131**, 60-67.

WORMSER G.P., BOTTONE E.J., « *Cardiobacterium hominis* : Review of microbiologie and clinical features », *Rev. Infect. Dis.*, 1983, **5**, 680-691.

SECTION VI — BACILLES A GRAM NÉGATIF AÉROBIES STRICTS

Chapitre XXII LES PSEUDOMONAS

LE GENRE PSEUDOMONAS

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

A - Définition

Bacilles à Gram négatif, mobiles par une ciliature polaire, rarement immobiles, non sporulés.

Bactéries chimio-organotrophes avec un métabolisme strictement respiratoire avec comme accepteur terminal d'électrons l'oxygène en aérobiose et pour certaines espèces le nitrate en anaérobiose avec synthèse d'une nitrate-réductase (« respiration des nitrates »).

Oxydatifs ou inactifs dans l'épreuve de Hugh et Leifson.

Presque toujours oxydase (+) c'est-à-dire possédant pour la plupart une chaîne cytochromique complète comprenant le cytochrome C et une cytochrome C oxydase.

Caractérisés par la pluralité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie.

Bactéries très répandues dans la nature, caractérisées par leur résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques.

G + C % compris entre 58 et 70 (assez homogène).

B - Morphologie et structure

Bâtonnets droits et fins 0,5 à 1,3 μm .

Structure des bacilles à Gram négatif, pas de différence significative dans la structure du peptidoglycane de la paroi.

Mobilité très vive en aérobiose. Ciliature polaire : monotriche - multitriche. Pour les espèces multitriches le type de ciliature ne peut être établi que statistiquement en déterminant l'index flagellaire. Elle peut varier selon les conditions de culture. Quelques souches et *P. mallei* sont immobiles et aciliées.

C - Croissance et nutrition

De nombreuses espèces ou souches de *Pseudomonas* ne cultivent pas à 37°C alors que la **température de 30°C** convient à tous, pathogènes et saprophytes.

La culture est facile sur milieu complexe avec ou sans production de pigment. Ils sont capables de cultiver sur des milieux minéraux synthétiques avec une source simple de carbone : acétate, pyruvate. Ces propriétés sont utilisées pour mettre en évidence les auxotrophies nécessaires pour l'identification.

L'auxotrophie, ou besoins en facteurs de croissance, est caractéristique pour :

X. (P.) maltophilia : méthionine ou cystine.

P. diminuta - *P. vesicularis* : pantothénate, biotine, cyanocobalamine.

Depuis l'article de base de Stanier, Palleroni, Doudoroff (*J. Gen. Microbiol.*, 1966, 43, 159-271), l'étude taxonomique des différentes espèces est possible d'après l'étude des substrats carbonés utilisables comme source d'énergie pour la croissance. C'est l'auxanogramme.

. D - Pigments élaborés par les *Pseudomonas*

Les deux pigments les plus fréquents et caractéristiques sont la pyocyanine et la pyoverdine.

Ds sont solubles dans les milieux de culture, et peuvent les colorer.

Les espèces pigmentées sont par exemple :

- *P. aeruginosa* : pyocyanine + pyoverdine, il possède l'un ou l'autre ou les deux, mais pouvant être perdus par mutation. Il existe des variétés mélanogènes ou érythroènes produisant un pigment noir ou un pigment rouge.
- *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae*, et *P. cichorii* produisent de la pyoverdine mais certaines souches sont parfois apigmentées.
- *P. aureofaciens* : pigment jaune orange ou pourpre.

E - Caractères physiologiques

Ces bactéries ont une longévité faible en culture même à 4°C.

- Tous les modes de conservation possibles sont proposés : lyophilisation, eau distillée stérile avec une anse de culture à température ordinaire de 18°C (*Pseudomonas* phytopathogènes), gélose inclinée avec huile de paraffine, surface d'une gélose molle, tube à vis comme pour les Entérobactéries, congélation.
- Propriétés lytiques : *P. aeruginosa* - autolyse tardive (4 à 5 jours) ou précoce (taches irisées à reflets métalliques sur gélose).
- Sensibilité aux agents lyriques : plusieurs espèces de *Pseudomonas* sont lysogènes et bactériocinogènes
 - *P. aeruginosa* : probablement 100 % de souches lysogènes + nombreuses pyocines.
 - *P. fluorescens* : lysogénie fréquente ; fluocines.
 - *P. stutzeri* : lysogénie encore peu étudiée.

Ces caractères présentent un intérêt épidémiologique.

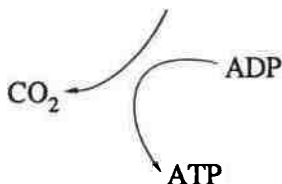
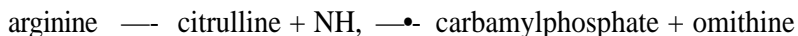
F - Métabolisme

Les *Pseudomonas* constituent le modèle des bactéries oxydantes ou dites *oxybiontiques*. Le rendement de la croissance est strictement dépendant de la concentration en oxygène dissout donc de l'agitation.

- Les enzymes de la glycolyse (voie fermentative d'Embden-Meyerhof) sont absentes.
- L'oxydation complète du glucose en aérobiose est réalisée dans le shunt de l'hexose monophosphate ou voie de Warburg-Dickens-Horecker par l'intermédiaire du

6 P-gluconate, la voie du 2-céto-3 désoxygluconate (voie d'Entner-Doudoroff aboutissant au pyruvate qui alimente le cycle de Krebs). D'où l'intérêt du milieu de Hugh et Leifson (acidification dans le tube sans vaseline en aérobiose).

Paradoxalement pour des organismes aérobies stricts certains *Pseudomonas* peuvent tirer leur énergie d'une réaction catabolique en anaérobiose, par hydrolyse de l'arginine = système de **l'arginine dihydrolase** (ADH) qui est constitutif :



Ce système a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle la mobilité due au mouvement de flagelles est liée à l'ATP. Il est mis en évidence chez *Pseudomonas fluorescens*, immobile en anaérobiose mais qui devient mobile en présence d'arginine. Cette réaction a une importance taxonomique. On note une alcalinisation du milieu donnant une coloration violette caractéristique (Milieu de Moeller).

L'attaque des hydrates de carbone par oxydation peut être à la base de l'identification des *Pseudomonas*, mais toutes les espèces ne donnent pas de produits acides à partir de sucres comme le glucose ; certaines donnent une alcalinisation ou sont inactives.

II - CLASSIFICATION

Le genre *Pseudomonas* est un genre pléthorique avec 160 espèces répertoriées en 1957. En réalité, beaucoup de ces souches ne sont que des *nomenspecies* mal connues et dont l'espèce-type ne peut être définie. Deux cent soixante cinq espèces étaient répertoriées, mais l'édition 1974 du Bergey's Manual retenait 29 espèces dont 13 d'intérêt médical. La nouvelle édition 1984 du Bergey's Manual retient 30 espèces principales.

La famille des *Pseudomonadaceae* regroupe actuellement 5 genres : *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Frateria*, *Xanthomonas* et *Zoogloea*.

Un certain nombre d'études génétiques ont été réalisées et ont permis de diviser le genre *Pseudomonas* en 5 **groupes d'affinité génétique** différents : Groupes d'homologies d'après les hybridations ADN-rARN et ADN-ADN.

- Groupe génomique I groupe *fluorescens* + groupe *stutzeri* + groupe *alcaligenes*
- Groupe génomique II groupe *pseudomallei* + *cepacia*
- Groupe génomique III groupe *acidovorans*
- Groupe génomique IV groupe *diminuta-vesicularis*
- Groupe génomique V groupe *maltophilia* (*Xanthomonas*)

Il faut avoir conscience, et ceci est vrai pour toute bactérie largement répandue dans la nature, que le diagnostic d'une souche de *Pseudomonas* sera souvent effectué par la combinaison de plusieurs caractères. Ces germes ubiquitaires présentent de très nombreux biotypes qui tendent à s'écarter de l'espèce-type.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Le bacille pyocyanique

Le bacille pyocyanique, du grec *puon* = pus et du grec *kuanos* = bleu foncé, est désigné sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* du latin *aeruginosus* = couvert de rouille. Isolé en 1882 par Gessard.

C'est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*. La plus pathogène, elle constitue l'espèce-type du genre.

1 - HABITAT

C'est une bactérie qui vit normalement à l'état de **saprophyte** dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Elle résiste mal à la dessiccation. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Le *B. pyocyanique* peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, sur des supports et des matériels surtout s'ils sont **humides**.

Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales.

II - MORPHOLOGIE ET CARACTÈRES CULTURAUX

Bacille à Gram négatif— 1 à 3 p.m de long ; 0,5 à 1 u.m de large.

Parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée **slime** qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie.

Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux en aérobiose (température de 37°C ou 30°C). Il dégage une **odeur aromatique** caractéristique de seringa due à la production d'ortho-amino-acétophénone, intermédiaire du métabolisme du tryptophane et non liée à la production de pigment. Un milieu sélectif comme le milieu de Drigalski convient pour la culture. Des milieux sélectifs à base de **Cétrimide** que l'on peut additionner d'antibiotique (ac. nalidixique) sont proposés pour la recherche dans des produits très contaminés ou les eaux (hydrologie).

A - Aspects des colonies

Ils sont particuliers à cette espèce. Une dissociation spontanée en 3 types principaux peut être observée :

- *colonies la* (« large ») : isolées, grandes avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier — *Fried Eggs* (œufs sur le plat). Elles sont caractérisées par une autolyse qui donne un aspect métallique, irisé lors de la culture en nappe de la bactérie. Ce phénomène est lié à l'action des enzymes protéolytiques bactériennes.
- *colonies Sm* (« small ») : petites, mates légèrement bombées avec un bord circulaire régulier.
- *colonies M* (*muqueuse*), bombées, opaques, visqueuses parfois coulantes comme pour *Klebsiella*. Ces colonies se rencontrent presque spécifiquement dans des infections chroniques, urinaires ou pulmonaires. La bactérie produit alors un polysaccharide extra-cellulaire (l'acide alginique) qui est différent du « slime ».

B - Production de pigments

C'est l'une des caractéristiques de cette espèce ; ils servent à son identification. Cette propriété n'est corrélée ni avec la virulence, ni avec la protection. Ces pigments sont fluorescents ou non fluorescents.

1. Pyoverdine

Pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme de poids moléculaire 1500, chromophore quinolinique associé à deux petits peptides. C'est un sidérophore qui en se complexant avec les ions Fe^{+++} permet de capter le fer extracellulaire. Oxydé en pyorubine dans les vieilles cultures. Mis en évidence dans le milieu de King B (phosphate, sulfate, glycérol, peptone), sa production est inhibée par les ions sodium et favorisée dans les milieux carences en fer.

2. Pyocyanine

Pigment bleu soluble dans l'eau et le chloroforme, caractéristique de *P. aeruginosa* qui est la seule espèce à le produire (composé fortement polaire, de nature phénazinique). La synthèse de ce pigment est diminuée en présence d'un excès d'ions phosphate et sodium. C'est un indicateur de pH, en solution à pH 3 = rouge, en milieu neutre ou alcalin = bleu. Il peut jouer le rôle d'accepteur terminal d'électrons si la chaîne respiratoire est inhibée par exemple par l'azide de Na.

La pyocyanine a de plus une action bactériostatique sur certaines bactéries en particulier à Gram positif. Elle est mise en évidence dans le milieu A de King (faible teneur en sels minéraux, glycérol, peptone pepsique).

Il existe des souches apigmentées ; moins de 5 % des souches sauvages ne produisent pas l'un ou l'autre de ces pigments. Elles sont fréquemment isolées chez des malades traités aux antibiotiques.

Il existe des souches mélanogènes = pigment brun noir diffusant (ne produisant pas de pyocyanine ni de pyoverdine) isolées de lésions purulentes.

Il existe encore des variétés érythroènes = pigment rouge-brun aérogénosine A, parfois appelée pyorubine.

Il faut noter que d'autres *Pseudomonas* produisent des pigments notamment des espèces phytopathogènes et il convient d'en faire le diagnostic différentiel : *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. lemonieri*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*, *P. vesicularis*, *X. (P.) maltophilia*, *P. paucimobilis*.

III - IDENTIFICATION BACTÉRIOLOGIQUE

Le diagnostic est facile : oxydase (+), culture à 37°C : culture à 41°C mais pas à 4°C. Il est préférable d'étudier les caractères biochimiques à 30°C. Milieux A et B de King (production de pyocyanine et pyoverdine), oxydation de certains sucres avec production d'acides, utilisation comme seule source de carbone et d'énergie de nombreux substrats hydrocarbonés (réalisation de l'auxanogramme dans un milieu minéral simple).

Hydrolyse : gélatine, lécithine, DNA.

En anaérobiose respire les nitrates d'où une confusion si la gélose profonde contient des nitrates, mais son métabolisme est uniquement respiratoire.

Arginine dihydrolase positive.

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES PRINCIPALES ESPÈCES DU GENRE
PSEUDOMONAS
 (d'après C. Richard)

Test	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>X. maltophilia</i>	<i>P. cepacia</i>	<i>P. stutzeri</i>
LDC	-	-	-	+	d	-
ODC	-	-	-	-	d	-
ADH	+	+	+	-	-	-
Dénitfification	+	d	-	-	-	+
Culture 41°	+	-	(-)	-	-	d
Gélatinase	+	+	-	+	(+)	-
Esculine	-	-	-	+	d	-
Citrate Simmons	+	+	+	-	+	+
KingA	d	-	-	-	-	-
KingB	d	d	d	-	-	-
Caractères particuliers	TTR ⁻¹	TTR ⁴	TTR ¹	Oxydase - ou + lent Besoin en facteur de croissance	Oxydase +lent. Pas de besoin en facteur de croissance	Colonies sèches plissées
TTR = Tétrathionate-réductase				TTR ⁺	TTR ⁻	Amylase+

IV - SUBSTANCES TOXIQUES ET PRODUITS ÉLABORÉS

En dehors des pigments, dont nous venons de voir l'intérêt pour l'identification, le *B. pyocyanique* élabore des protéines et des substances toxiques pour l'homme, l'animal de laboratoire ou les plantes. On distingue principalement : une hémolysine thermostable, des exo-enzymes (protéases, phospholipase) et des toxines protéiques (exotoxine, entérotoxine).

Hémolysines

Deux hémolysines sont produites : un glycolipide thermostable et une phospholipase C.

- Le glycolipide hémolytique est une substance de bas poids moléculaire non enzymatique et non antigénique thermostable et relativement peu toxique.
- Phospholipase C. L'hydrolyse de la lécithine est due à une lécithinase, thermolabile, comparable à la toxine alpha de *Clostridium perfringens*. Elle produit une réaction inflammatoire limitée, œdémateuse, érythémateuse ou hémorragique chez l'animal ressemblant à ce qui s'observe chez l'homme dans certaines formes cutanées d'infection à *P. aeruginosa*.

Protéases

P. aeruginosa produit des enzymes protéolytiques (élastase, protéase alcaline, collagénase, caséinase) qui sont des facteurs de virulence car leurs actions se combinent, expliquant les destructions tissulaires observées lors d'une infection.

Exotoxine A

Cette toxine létale a été découverte par LIU dans le sang de lapins moribonds après injection d'une culture vivante. Elle n'a pas d'activité protéolytique ou lécithinasique (purifiée, 66,6 kDa, 2 sous-unités A et B, DL 50 de 0,05 à 0,10 u.g pour la souris). Cette toxine a le même mécanisme d'action que la toxine diphtérique (toxine ADP-ribosylante) agissant en inhibant la synthèse protéique par altération du facteur d'élongation EF₂. La toxinogénèse n'est pas liée à la présence d'un phage lysogène. Cette toxine est produite par plus de 90 % des souches.

Exoenzyme S

Certaines souches de *P. aeruginosa* produisent une autre substance toxique différente de l'exotoxine A, ayant une activité ADP-ribosyltransférase, excrétée par 40 % des souches.

Cytotoxine

La cytotoxine ("leucocidine") est une protéine de 25,1 kDa ayant une action lyrique à faible dose sur différents types cellulaires en particulier les leucocytes (PMN, lymphocytes), produite par plus de 95 % des souches.

Entérotoxine

Elle est mal connue. Elle provoque une accumulation hydrique dans l'anse ligaturée de lapin et pourrait être à l'origine d'entérocolite à *B. pyocyanique*.

Facteur de perméabilité vasculaire

V - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Peu virulent pour l'individu normal, le *B. pyocyanique* est par contre un agent infectieux redoutable lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. *P. aeruginosa* est l'exemple type de la bactérie **pathogène opportuniste**.

Les malades particulièrement sensibles sont les nourrissons, les personnes âgées, les sujets atteints d'affections graves, chroniques, métaboliques (diabète) mais surtout hématologiques ou cancéreuses. Les traitements immunosuppresseurs, les corticoïdes, les antimétabolites favorisent l'infection à *B. pyocyanique* d'origine endogène. Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de mortalité. La croûte humide et l'amoinissement des moyens locaux de défense favorisent la prolifération rapide du germe. Enfin le traitement curatif ou préventif des malades à hauts risques par des antibiotiques à large spectre contribue largement à l'augmentation de la fréquence des infections à bactéries multirésistantes, parmi lesquelles *P. aeruginosa* joue un rôle prépondérant.

A - Infections pulmonaires

Elles peuvent être primitives ou secondaires à une septicémie.

Les pneumopathies primitives s'observent exceptionnellement chez le sujet sain mais sont le lot courant des malades trachéotomisés, des insuffisants respiratoires sous antibiothérapie prolongée, des malades atteints d'hémopathies ou de cancers et recevant une chimiothérapie. L'évolution est sévère (mortalité 30 à 50 %), le germe est isolé des expectorations alors que les hémocultures sont habituellement négatives.

La **mucoviscidose** (enfants atteints de fibrose kystique au pancréas) se complique de surinfections bronchiques bactériennes notamment à *S. aureus* dans les premières années, puis sous l'influence de l'antibiothérapie, à *B. pyocyanique* dans 70 à 90 % des cas. L'isolement de souches muqueuses M produisant de l'exopolysaccharide muqueux (alginate : polymère d'acide mannuronique et d'acide guluronique) est caractéristique.

Enfin une atteinte pulmonaire peut s'observer au cours des septicémies à *B. pyocyanique*.

B - Infections uro-génitales

Très fréquentes, elles ne sont jamais primitives, mais toujours secondaires à une exploration des voies urinaires : simple cystoscopie ou sondage vésical, sonde uréthrale à demeure, intervention rénale ou prostatique...

C - Infections ostéo-articulaires

Le *B. pyocyanique* est à l'origine de 10 % environ des ostéites et de 20 % des arthrites septiques. Les ostéites secondaires, les plus fréquentes, succèdent à une fracture ouverte ou à une intervention avec mise en place d'un matériel étranger, ou surinfections d'ulcérations cutanées chez un diabétique. Les ostéites primitives d'origine hématogène se voient essentiellement chez les héroïnomanes et touchent électivement les vertèbres.

D - Infections oculaires

Le *B. pyocyanique* peut être présent à l'état de saprophyte dans les culs de sac conjonctivaux. Dans certaines conditions, il peut entraîner des infections superficielles de l'oeil, par exemple des blépharo-conjonctivites ont été observées au cours de chimiothérapies anticancéreuses chez des malades porteurs de lentilles coméennes après l'utilisation de mascara contaminé.

En fait, ces infections sont rares mais elles sont gravissimes. Le *B. pyocyanique* est responsable de 15 à 20 % des surinfections bactériennes d'ulcérations coméennes. Elles gagnent très vite l'ensemble du globe oculaire. Cette panophtalmie appelée, avec raison, **fonte purulente de l'oeil**, est une complication redoutable de la chirurgie ou des investigations ophtalmologiques.

E - Infections O.R.L.

Le *B. pyocyanique* n'est pas un saprophyte courant du conduit auditif externe ; seuls 1 % des individus sains en sont porteurs. Il est par contre isolé chez 45 à 65 % des sujets ayant une otite externe banale.

L'otite maligne à *B. pyocyanique* a pu être observée chez les diabétiques âgés. Le terme malin a été employé en raison des possibilités d'extension.

Récemment une nouvelle forme d'otite externe à *B. pyocyanique* a été décrite sous le terme « d'oreille des plongeurs », atteignant les plongeurs des stations de recherches pétrolières en Mer du Nord.

F - Infections méningées

Elles sont rares : 2 % des méningites dans leur ensemble, toutefois 10 % des méningites après intervention neuro-chirurgicale sont dues à *P. aeruginosa*.

G - Infections cutanées

Chez le sujet sain on peut observer un onyxis avec perionyxis réalisant l'ongle vert, des infections interdigitales, des surinfections d'ulcères de jambe. Des lésions cutanées polymorphes connues sous le nom *Secthyma gangrenosum* se rencontrent au cours de septicémies en particulier chez les leucémiques. Chez les brûlés la colonisation des lésions par le *B. pyocyanique* est rapide ; à la trentième heure, 20 % des lésions sont infectées, 48 % à la quarante-huitième heure et plus de 60 % au cinquième jour. Le risque majeur est bien la septicémie, brutale, dont le taux de mortalité est élevé : environ 50 %.

Des infections cutanées à *B. pyocyanique* peuvent s'observer en climat chaud et humide, mais également chez tout sujet en contact avec une eau contaminée. En particulier sous nos climats, la vogue actuelle des bains en eau tiède ou chaude (bains bouillonnants, balnéothérapie, applications de boues réchauffées ou thermales, bains médicaux, thalassothérapie, bains romains) peuvent être à l'origine de folliculites à *pyocyanique*. Le traitement par le chlore de ces eaux à usage récréatif est parfois absent, souvent insuffisant et inefficace (conditions de pH, filtration, aération...). Un risque existe également pour les baignades dans des eaux stagnantes ou mal renouvelées ou non épurées (gravières, anses du bord de mer sans courants ou à faible marée surpeuplées en été, à proximité d'égouts) où sont associées, bien sûr d'autres bactéries hydriques.

H - Septicémies

Elles sont en augmentation **régulière, comme** d'ailleurs les autres septicémies à bacilles Gram négatif.

Ces septicémies s'observent d'une part chez les nouveaux-nés et d'autre part chez les adultes traités par des corticoïdes ou des antimétabolites. Elles succèdent aux surinfections cutanées des brûlés, aux proliférations bactériennes des malades trachéotomisés. Enfin les cathéters et les sondes constituent également des portes d'entrée. Le pronostic des septicémies à *B. pyocyanique* est sévère ; la mortalité est supérieure à 50 % mais celle-ci dépend bien entendu de l'affection sous-jacente puis de la précocité et du choix du traitement.

J - Entérites à *B. pyocyanique*

Leur mécanisme physiopathologique est proche de celui d'autres entérites. Elles sont très **rares**. On a décrit des épidémies de diarrhées dans des pouponnières.

Les trois formes cliniques sont :

- l'entérite aiguë : consécutive à une antibiothérapie à large spectre ou l'ingestion d'aliments très contaminés
- la typhlite : colite nécrosante localisée au caecum survenant chez des sujets leucémiques et neutropéniques
- l'entérite hydrique (Fièvre de Shanghai) avec un tableau de fièvre typhoïde, liée à l'absorption d'eaux polluées.

Toutefois l'isolement dans les selles de *P. aeruginosa* ne doit pas conduire à une antibiothérapie systématique.

K - Endocardites

Environ 1 % des endocardites peuvent être dues au *B. pyocyanique*. La fréquence des endocardites tricuspidiennes augmente chez les drogués.

VI - MODÈLE PHYSIOPATHOLOGIQUE

P. aeruginosa colonise les muqueuses ou les plaies et adhère grâce aux facteurs d'adhésion ou aux composés polysaccharidiques externes. Chez un patient non immunisé contre une souche du même sérotype 0 une multiplication rapide des bactéries se produit et sous l'influence des différents facteurs de virulence déjà cités et en particulier du LPS-endotoxine, il se forme un foyer inflammatoire local. Dans ce foyer se concentrent de nombreux phagocytes, polynucléaires qui vont dans les cas favorables assurer la destruction rapide des bactéries. Des anticorps sériques spécifiques d'espèce pour les enzymes ou de groupe pour le LPS sont produits en quelques jours, mais trop tard pour jouer un rôle dans les phénomènes immédiats.

En cas de déficience immunitaire portant sur le nombre et/ou la qualité des polynucléaires, la phagocytose est insuffisante et le stade d'invasion succède à la colonisation. Les bactéries débordent alors les barrières cellulaires de défense dans le

foyer inflammatoire et se multiplient ; une bactériémie est habituellement constatée avec localisations secondaires. La production d'exotoxine est intense et sa diffusion large. En raison des facteurs de virulence diversifiés de ce germe, un modèle physiopathologique simple ne peut rendre compte de la complexité pathogénique de l'infection.

VII - ÉPIDÉMIOLOGIE

La nature **nosocomiale** de la plupart des infections à *P. aeruginosa* rend nécessaire la connaissance parfaite des mécanismes de transmission. L'utilisation de marqueurs épidémiologiques (sérotypie, lysotypie, pyocinotypie) fiables permet de suivre les épidémies hospitalières et d'envisager la lutte contre les sources de contamination.

A - Sources de contamination

Le milieu extérieur et l'eau sous toutes ses formes ou le malade lui-même par ses exsudats (urines, crachats, selles,...)

L'environnement hospitalier : fleurs coupées (eau des vases), plantes en pots, fruits, légumes crus ou en salade (tomates, carottes, radis, laitues), siphons d'éviers ou de sol, humidificateurs, respirateurs, eau distillée, (possibilité de multiplication jusqu'à 10^7 germes/ml, sans trouble visible).

Antiseptiques : par exemple les ammoniums **quaternaires sont souvent inactifs et** permettent la multiplication de la bactérie.

B - Vecteurs de contamination

La transmission à partir d'une source de contamination initiale à un malade ou de patient à patient, résulte de la contamination ou la souillure des supports inertes, des mains des visiteurs et surtout du personnel qui véhiculent la bactérie selon un schéma épidémiologique désormais classique. Dans les services de réanimation, les malades trachéotomisés hébergent rapidement du *B. pyocyane* qui colonise la partie supérieure du tractus respiratoire. Le germe pourra ainsi disséminer dans le service.

C - Marqueurs épidémiologiques

Les marqueurs épidémiologiques à disposition sont : la sérotypie, la lysotypie et la pyocinotypie. L'antibiotype ne constitue qu'une indication en général insuffisante.

La sérotypie est le marqueur le plus couramment utilisé alors que la lysotypie et la pyocinotypie sont réalisées par des laboratoires spécialisés.

1. Sérotypie

La classification antigénique de Habs comprend actuellement 17 sérogroupes O (correspondant aux AgO lipopolysaccharidiques, thermostables) qui permettent d'identifier 90 à 95 % des souches par une technique d'agglutination sur lame (mimunsérums Diagnostics Pasteur).

Les sérogroupes O les plus fréquents sont 01, 05, 06 et 011 (ce dernier ayant la particularité de présenter une activité ONPG hydrolase).

Lors des bactériennes, on isole plus fréquemment les sérogroupes 01, 2, 5, 6, 7, 10 et 11.

La distribution géographique mondiale des sérogroupes est très variable entre, d'une part des souches cosmopolites plus ou moins fréquentes, et d'autre part des souches rares (014, 15,17) absentes dans certains pays.

La détermination des sérotypes H (correspondant aux antigènes protéiques flagellaires, thermolabiles) permet d'abaisser le pourcentage des souches non typables, mais cette technique n'est pas utilisée couramment.

2. Lysotypie

Le bacille pyocyanique peut être lysé par de nombreux phages lytiques. La majorité des souches sont lysogènes, voire poly-lysogènes. Une même souche peut ainsi héberger, intégrés sur le chromosome ou sur un plasmide, une dizaine de phages tempérés. Cette haute fréquence de lysogénie est d'ailleurs caractéristique de *P. aeruginosa* et est rarement rencontrée dans d'autres espèces de *Pseudomonas*.

La lysotypie employant 17 bactériophages selon la méthode de LINDBERG permet ainsi de marquer 98 % des souches, et le nombre des lysotypes est actuellement voisin de 300. C'est une excellente méthode complémentaire de la sérotypie dans l'étude épidémiologique locale.

3. Pyocinotypie

La pyocinotypie consiste en la mise en évidence de la production de bactériocines : pyocines = aeruginocines. Cette technique est relativement simple à condition de disposer de quelques souches sensibles nécessaires pour les révéler.

Les **pyocines** sont classées en 2 types principaux :

- type S : sensible aux enzymes protéolytiques, ne montrant pas de forme particulière en microscopie électronique
- type R : résistant aux enzymes protéolytiques ayant une structure de cylindre creux et double ressemblant à une queue de bactériophage en microscopie électronique. Celles-ci pourraient être des phages défectifs. La pyocinotypie permet, à l'aide de la méthode décrite par Fyfe, Harris et Govan en 1984 utilisant 13 souches indicatrices, de distinguer 105 types principaux et 25 sous-types.

L'une des trois méthodes permet de marquer 90 à 95 % des souches. Dans les cas difficiles, la combinaison de 2 méthodes améliore ce pourcentage. Les marqueurs épidémiologiques permettent de connaître la flore contaminant un service et ainsi de déterminer avec une forte probabilité l'existence d'une contamination au sein du service (souche connue) ou d'une contamination endogène (souche nouvelle).

VIII - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

A - Sensibilité aux antibiotiques

P. aeruginosa n'est sensible qu'à quelques antibiotiques et le choix d'un traitement est donc important. Malgré l'efficacité de certains, le succès n'est souvent que relatif et l'effort de lutte contre les infections à *B. pyocyanique* doit passer avant tout par la prévention : mesures d'hygiène voire la vaccination.

P. aeruginosa est résistant à de nombreux antibiotiques, (benzylpénicillines, aminopénicillines, céphalosporines de 1^e et de 2^e générations, phénicolés, tétracyclines, triméthoprime). Cette résistance répond à trois mécanismes :

- l'imperméabilité de la paroi à certains antibiotiques (résistance naturelle pour les pénicillines M = méthicilline, cloxacilline ; résistance acquise faisant intervenir des porines = ticarcilline, cefsulodine, imipénème)
- l'inactivation enzymatique (17 bêta-lactamases plasmidiques, plusieurs types : PSE = *Pseudomonas* Spécific Enzyme, PSE-1 et PSE-4 : CARBécillinasés ; OXA = oxacillinasés ; TEM 1 et 2), résistance naturelle aux premières bêta-lactamines par synthèse d'une bêta-lactamase chromosomique habituellement réprimée (Case = céphalosporinase inductible de Sabath)
- modification de l'affinité de l'antibiotique pour la cible (PBP).

- Il existe au moins une trentaine de plasmides de résistance connus chez *P. aeruginosa* pouvant coder pour une multirésistance touchant bêta-lactamines et aminosides. Formant une dizaine de groupes d'incompatibilité, ils se distribuent schématiquement en trois catégories : des plasmides spécifiques du genre *Pseudomonas*, des plasmides pouvant circuler entre *Pseudomonas* et Entérobactéries, des plasmides habituels des Entérobactéries retrouvés parfois chez *Pseudomonas*.

Ces quelques données générales expliquent les phénotypes de résistance très divers qui sont observés et combien il est difficile sur la base de la valeur des CMI publiées d'établir une hiérarchie parmi les molécules antitypocyaniques proposées. La conjoncture épidémiologique variable d'un hôpital et d'un service à l'autre, rend aléatoire toute prévision de sensibilité.

Le choix d'une bêta-lactamine pourra se faire en fonction de l'antibiogramme parmi les carboxypénicillines (ticarcilline, association ticarcilline + ac. clavulanique) ayant une bonne vitesse de bactéricidie comme l'imipénème, les acyluréidopénicillines (aziocilline, pipéracilline), acylpénicillines (apalcilline), certaines céphalosporines (cefsulodine et ceftazidime), monobactame (aztréonam), carbapénème (imipénème). En outre, l'association la plus efficace d'une bêta-lactamine à un aminoside sera souvent recherchée afin d'être rapidement bactéricide dans les infections généralisées. Parmi les aminosides plusieurs phénotypes de résistance sont observés, l'amikacine restant la plus active. La diminution de la perméabilité aux bêta-lactamines affectant également les aminosides rend certaines souches particulièrement résistantes. *P. aeruginosa* est résistant à l'acide nalidixique mais les quinolones de 2^e génération, ont une activité intéressante : la péfloxacin, la norfloxacin, l'ofloxacin et la ciprofloxacine donnant les CMI les plus basses.

Les aminosides associées aux bêta-lactamines antitypocyaniques constituent le traitement de première intention.

La sensibilité de *P. aeruginosa* à la colistine est constante, mais son efficacité *in vivo* est décevante. Certaines souches sont sensibles à la fosfomycine, mais cet antibiotique doit être associé pour éviter l'émergence rapide de mutants résistants. Dans la réalisation de l'antibiogramme, un inoculum trop lourd est un écueil à éviter. Cela est dû à la tendance des corps bactériens à former des agglutinats.

B - Protection par la vaccination

La prévention de l'infection, notamment en milieu hospitalier, passe avant tout par des mesures d'hygiène générale et dans le choix des antiseptiques.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'immunoprévention des infections à *B. pyocyanique*.

Les études expérimentales ont débuté en 1960 et se sont constituées dans plusieurs directions. Aux U.S.A. : vaccin Pseudogène (7 sérotypes - Heptavalent Lipopolysaccharide Préparation), au Royaume Uni : vaccin polyvalent soluble (antigènes de surface - 16 sérotypes - vaccin PEV-01), en Roumanie : suspension bactérienne chauffée (11 sérotypes), en France : vaccin mixte polyvalent (10 sérotypes, suspension bactérienne chauffée + staphylocoque + anatoxine staphylococcique).

Leurs applications cliniques peuvent se résumer actuellement à l'utilisation de deux types de vaccins :

- vaccins bactériens (suspension de bactéries chauffées)
- vaccins acellulaires (extraits purifiés divers, mais contenant habituellement du LPS).

En France, le vaccin cellulaire polyvalent est utilisé en prophylaxie chez les grands brûlés.

L'immunothérapie est parfois préconisée avec immunoglobulines naturelles ou hyperimmunes.

LES AUTRES PSEUDOMONAS

Parmi les *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* représente entre 60 et 80 % des souches isolées en clinique, mais d'autres espèces peuvent se rencontrer : *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. paucimobilis*, *P. acidovorans*... Les phénomènes conduisant à l'isolement de *P. aeruginosa* en milieu hospitalier favorisent également l'essaimage des autres *Pseudomonas*. Cependant ces derniers ont des potentialités métaboliques différentes et un pouvoir pathogène moindre que le *B. pyocyaneus*. Aussi ces *Pseudomonas* ont-ils une moindre importance en pathologie humaine. Leur isolement est souvent fonction de l'écologie locale et le plus souvent limitée aux services à hauts risques infectieux. Il faut aussi retenir que ces germes sont souvent multirésistants aux agents antibactériens. Ils peuvent se développer à partir de multiples substrats hydrocarbonés simples ou complexes. En raison de leur pouvoir pathogène spécifique, deux espèces se placent tout à fait à part : *P. mallei*, agent de la morve et *P. pseudomallei*, ou *B. de Whitmore*, agent de la mélioïdose.

I - PSEUDOMONAS MALLEI : LA MORVE

La morve est une maladie qui touche essentiellement les équidés et qui est connue depuis l'antiquité. *P. mallei* est un parasite obligatoire des muqueuses des animaux ou de l'homme. Du point de vue bactériologique ce germe est toujours **immobile** et accumule du poly-bêta-hydroxybutyrate. La morve est une maladie grave transmissible à l'homme. Maladie disparue des pays développés grâce aux progrès de la médecine vétérinaire, elle subsiste encore en Asie et en Afrique. Le dépistage des animaux atteints se fait grâce à une injection intradermique de malleïne dont la positivité entraîne l'abattage du cheptel infecté.

II - PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI : LA MÉLIOÏDOSE

Whitmore et Karischnaswami ont décrit en 1912 à Rangoon en Birmanie une maladie proche de la morve qu'ils appelèrent mélioïdose. *P. pseudomallei* ou *B. de Whitmore* se trouve dans l'eau et les sols humides.

Ce germe a longtemps été considéré comme caractéristique des zones humides de Sud-Est Asiatique, où l'humidité liée à une température élevée (40-43°C) des eaux de rizière réalise des conditions optimales de croissance. Cependant il s'avère que ce germe est ubiquitaire. Son isolement a été réalisé en France ainsi que dans plusieurs pays des zones inter-tropicales : il est donc présent dans une zone comprise entre les vingtièmes parallèles Nord et Sud. Une meilleure connaissance de cette affection a été acquise à la suite des guerres d'Indochine puis du Vietnam. La transmission du *B. de Whitmore* peut se faire par ingestion d'eau contaminée, pénétration à travers la peau excoriée (plaies, griffures, blessures), contamination par voie aérienne par des poussières mobilisées par le vent ou aérosols créés par le souffle des pales d'hélicoptères. Cette maladie a été observée également en France (épidémies chez des animaux du Jardin des Plantes et dans un élevage en Mayenne).

Du point de vue clinique, la mélioïdose est une infection suppurative échappant à une description générale simple en raison de la diversité des formes et des localisations. On rencontre des formes aiguës septicopyhémiques avec localisations secondaires, mais également des formes subaiguës plus fréquentes et des formes chroniques. Contractée essentiellement dans les régions du Sud-est asiatique, tout au

moins dans les cas récemment rapportés, la mélioïdose peut survenir longtemps après la contamination, en particulier chez les sujets immunodéprimés, elle doit être évoquée lors de fièvres chez des sujets migrants en provenance de ces régions. Des abcès spléniques ont été décrits, la ceftazidime paraîtrait la plus active.

Le diagnostic bactériologique est effectué à partir de divers prélèvements (sang, pus, crachats). Le germe peut être cultivé sur divers milieux. Le diagnostic différentiel se fera avec *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. mallei*. Le pouvoir pathogène expérimental est réalisé chez le hamster ou le cobaye : après inoculation par voie intra-péritonéale on observe une péritonite purulente, une périorchite (signe de Straus), des suppurations polyviscérales et en premier lieu pulmonaires.

III - LES AUTRES ESPÈCES DE PSEUDOMONAS D'INTÉRÊT MÉDICAL

Le genre *Pseudomonas* comprend beaucoup d'autres espèces qui peuvent être isolées chez l'homme ou chez l'animal mais également chez les plantes. La limite entre les *Pseudomonas* phytopathogènes et ceux d'intérêt médical est assez imprécise dans certains cas.

A - Habitat et pouvoir pathogène naturel

En raison de leurs exigences nutritives très modestes, les *Pseudomonas* peuvent survivre et se multiplier durant des mois dans un **environnement humide** : eau du robinet, eau distillée, écoulements d'éviers, surfaces humides, barboteurs, nébulisateurs. L'habitat habituel de ces germes est l'eau ainsi que le sol et les végétaux. Certaines souches psychrophiles provoquent la détérioration de denrées alimentaires ou de produits biologiques conservés au froid (*P. fluorescens* st *P. putida* par exemple). Inversement *P. cepacia* ou *P. pseudoalcaligenes* sont relativement résistants à la chaleur et peuvent se retrouver dans des eaux tièdes ou chaudes.

En milieu hospitalier la contamination des eaux, dans la diversité de leurs usages, est très souvent occulte et il faut souligner que des densités bactériennes de l'ordre de 10^7 germes/ml ne s'accompagnent pas de trouble visible à l'œil nu d'une solution aqueuse. Dans l'environnement hospitalier les *Pseudomonas* contaminent le plus souvent les solutions d'antiseptiques, plus actifs sur les germes à Gram positif que sur les bacilles à Gram négatif, ainsi que les solutions aqueuses. L'utilisation de ces **solutions contaminées** est responsable de la survenue d'infection chez des malades aux défenses immunitaires effondrées dans des services à hauts risques infectieux (réanimation, onco-hématologie, service de brûlés et de chirurgie cardio-vasculaire).

L'expression clinique d'une infection causée par ces germes opportunistes très peu pathogènes par eux-mêmes, dépendra essentiellement du terrain. Chez ces malades les surinfections locales peuvent entraîner des bactériennes simples, mais aussi des septicémies véritables avec localisations secondaires, par exemple des endocardites dans lesquelles les possibilités de diagnostic et de traitement antibiotique s'avèrent en général limitées.

B - Écologie et signification des différentes espèces de *Pseudomonas*

P. fluorescens et *P. putida* isolés pour la première fois en 1886 de pourritures diverses, ont comme principal habitat le sol, l'eau, les plantes et les denrées alimentaires avariées. Les eaux en milieu hospitalier sont souvent contaminées par *P. fluorescens*, espèce qui se trouve également très fréquemment dans les eaux douées naturelles même potables. *P. fluorescens* et *P. putida* peuvent se trouver dans la flore de l'oro-pharynx. *P. putida* s'isole en petite quantité, avec une fréquence égale au tiers de celle de *P. aeruginosa* et *P. maltophilia*, d'objets et de matériels hospitaliers. Ces deux espèces psychrophiles peuvent également contaminer le sang utilisé en transfusion qui peut être souillé lors du prélèvement ou par l'intermédiaire du matériel de perfusion mal stérilisé ou des flacons. Du point de vue de la bactériologie clinique *P. fluorescens* et *P. putida* sont avant tout des bactéries pathogènes opportunistes pour l'homme. Leur virulence est bien sûr quasiment nulle chez un individu sain. L'interprétation lors d'isolement de ces bactéries, unique ou répété, ne se fera qu'en fonction du contexte clinique. Les symptômes d'une septicémie survenant au décours d'une transfusion ou d'une perfusion de liquides contaminés s'expliquent par la présence d'une endotoxine semblable à celles des autres bacilles à Gram négatif.

P. stutzeri décrit pour la première fois en 1895 est isolé à partir du sol, d'engrais, de paille, d'humus, d'eaux stagnantes, de cosmétiques pour les yeux. Cette espèce peut se rencontrer dans

divers produits pathologiques d'origine humaine sans que l'on puisse y rattacher de circonstances épidémiologiques particulières.

P. mendocina a été isolé du sol, de l'eau et d'urines. Il n'a pas été impliqué comme agent causal dans des infections humaines.

P. cepacia (Syn., *Pseudomonas multivorans*, Stanier) isolé pour la première fois en 1950 d'un bulbe d'oignon est remarquable par la variété et le nombre de substrats qu'il peut utiliser comme source d'énergie et de carbone.

P. cepacia a été décrit à l'origine en 1950 comme un germe phytopathogène mais depuis ces dernières années son isolement lors de contamination ou d'infection hospitalières est plus fréquent. Neuf sérotypes O et 7 sérotypes H sont décrits. Largement distribué dans la nature, il a été isolé du sol, des eaux de rivière, du lait cru ou pasteurisé, d'œufs de canard salés importés de Taiwan aux U.S.A., de produits cosmétiques contaminés par l'eau du robinet.

L'environnement hospitalier permet d'isoler fréquemment *P. cepacia* : instruments, nébulisateurs, humidificateurs, appareils d'hémodialyse, bronchoscopes, sondes urinaires, cathéters, solutions anesthésiques, solutions antiseptiques à base d'ammoniums quaternaires, de cétrimide, de polyvidone iodée, de chlorhexidine qui contaminent la peau et les instruments, de solutés isotoniques injectables de chlorure de sodium, de solutions pharmaceutiques à base d'antibiotiques, d'albumine, de corticoïdes, d'eaux de diverses origines (eau du robinet, eau distillée d'origine commerciale ou préparée dans les pharmacies des hôpitaux, eau de bain-marié utilisée pour réchauffer le sang avant transfusion).

Chez des malades hospitalisés, *P. cepacia* peut être isolé : d'abcès, de plaies infectées, de lésions hyperkératosiques macérées d'orteils chez des soldats, d'arthrites aiguës (après injection de méthyl-prédnisolone contaminée), d'infections pulmonaires ou d'infections urinaires (après manœuvre instrumentale ou acte chirurgical), de péritonites. Etés infections plus sévères, bactériémies transitoires ou septicémies, sont rencontrées chez les malades aux défenses immunitaires altérées. Des endocardites sont apparues chez des malades porteurs de prothèses cardiaques ou ayant des antécédents cardiaques, et occasionnellement des héroïnomanes. *P. cepacia* peut être responsable de complications infectieuses en chirurgie cardiaque. La grande diversité de substrats utilisés par *P. cepacia* est responsable de la variété des sources potentielles de contamination et d'infection. Cependant, il paraît avoir une faible virulence et un pouvoir invasif limité chez l'homme sain. Il se rencontre dans les surinfections de la mucoviscidose.

P. putrefaciens possède les caractères des *Pseudomonas* ; cependant des auteurs proposent de lui attribuer le nom d'*Alteromonas putrefaciens* car certaines souches possèdent un flagelle latéral en plus du flagelle polaire habituel. La majorité des souches peut croître à 30°C, certaines ne poussent pas à 35°C et certaines sont psychrophiles. La particularité essentielle de ce germe est de produire de l' H_2S sur les milieux usuels pour Entérobactéries et ceci amène souvent des confusions avec *Salmonella* ou *Proteus*. *P. putrefaciens* se trouve dans le sol, les eaux douces et salées, les saumures et se distribue largement dans la nature. Il est isolé dans les produits alimentaires (morue, volaille, lait, œufs). *P. putrefaciens* est responsable d'altérations putrides du beurre, de la production d' H_2S dans les filets de harengs, de la décoloration verdâtre de la viande. En bactériologie médicale, cette espèce est isolée dans de nombreux produits pathologiques mais se comporte rarement comme un germe opportuniste bien qu'il ait pu être associé à des septicémies, des otites et des suppurations d'ulcère de jambe chez des diabétiques.

P. alcaligenes et *P. pseudoalcaligenes* ont été décrits en 1928 et en 1966. Ces deux espèces, très proches, ont été isolées d'eaux, de piscines, de lait contaminé et de divers produits pathologiques humains. Leur incidence en pathologie humaine est extrêmement faible, et seuls quelques cas isolés de contamination ou de surinfection ont été décrits.

P. diminuta et *P. vesicularis* sont deux espèces assez rares décrites l'une en 1954 l'autre en 1971. Ces *Pseudomonas* sont caractérisés par leurs exigences en biotine, acide pantothénique, cyanocobalamine et en outre, en cystéine pour *P. diminuta*. Isolés également de l'eau et de quelques produits pathologiques, leur rôle comme agents opportunistes ou pathogènes est incertain et leur isolement rare.

P. acidovorans et *P. testosteroni* sont deux espèces proches par le haut degré d'homologie existant entre leurs acides nucléiques. Leurs caractères biochimiques sont très voisins et en majorité négatifs. *P. acidovorans* a été isolé à partir d'urines, de sang, de pus, du tractus respiratoire chez l'homme et les animaux. Son rôle en pathologie humaine est discutable. *P. testosteroni* est responsable de rares cas de bactériémie.

D'autres espèces de *Pseudomonas* sont rarement rencontrées en bactériologie médicale. Ce sont essentiellement des souches issues de l'environnement. Elles posent souvent des problèmes de diagnostic différentiel.

P. pickettii décrit en 1973, a été isolé dans divers produits pathologiques.

P. paucimobilis s'apparente aux *Xanthomonas*. Il a été isolé dans des hémocultures, des LCR, des urines, des crachats, des frottis vaginaux et peut se mettre en évidence fréquemment dans les eaux de l'environnement naturel ou hospitalier.

C - Diagnostic bactériologique

Pour identifier ces *Pseudomonas* d'intérêt médical, le bactériologiste peut emprunter plusieurs voies en s'adressant soit à des méthodes traditionnelles, soit à des galeries miniaturisées prêtes à l'emploi. Cependant il est bon de se rappeler qu'une orientation correcte du diagnostic doit se faire dès le départ en prêtant une attention particulière à la morphologie du bacille et notamment à la détermination du type de ciliature qui est polaire dans le genre *Pseudomonas*, monotriche ou multitrèche. La coloration des flagelles, grâce aux méthodes de Rhodes ou de Leifson, est d'une utilité évidente. La morphologie des colonies est importante. Par exemple, les colonies plissées « rough » sont caractéristiques, pour un œil averti, de *P. stutzeri*. La production de pigment sur les milieux A et B de King, la pigmentation jaune ou rosé des colonies de certaines espèces sur gélose nutritive sont des éléments d'orientation. Enfin, la réaction de l'oxydase est importante ainsi que la détermination du type respiratoire en gélose profonde ne contenant pas de nitrates.

Les méthodes conventionnelles font appel aux caractères d'identification classiques des germes aérobies stricts (les méthodes usuelles pour les entérobactéries étant inadaptées) : ADH, LDC ; hydrolyse de glycosides : esculine, ONPG ; cultures à 4°C et à 41°C ; bouillon nitrate ; gélose profonde nitrate ; recherche d'activités enzymatiques (gélatinase, amylase, tween 80 estérase, lécithinase, DNase) ; accumulation de l'acide poly-bêta-hydroxybutyrique ; recherche de la production d'H₂S, recherche d'une tétrathionate réductase. Les caractères complémentaires sont basés :

- soit sur l'étude des substrats carbonés utilisables comme seule source d'énergie et de carbone (auxanogramme en milieu liquide M 63 : lactate, acétamide, arginine, glucose, maltose, tréhalose, mannitol, inositol, additionnés de facteur de croissance : méthionine),
- soit sur l'étude de l'oxydation de sucres conduisant à la production d'acide dans les milieux (glucose, fructose, mannose, lactose, maltose, mannitol...). D'autres tests biochimiques adaptés aux *Pseudomonas*, comme l'étude du clivage des diphenols, sont décrits dans les ouvrages spécialisés. Le tableau ci-après indique une clé d'orientation schématique et rapide pour l'identification de quelques *Pseudomonas* fréquents.

Des galeries d'identification miniaturisées commodes à l'emploi sont actuellement disponibles (Galerie *Pseudomonas*-Diagnostics-Pasteur, Oxi-Ferm Tube-Roche, Flow NF Tek, Galerie API 20 NE). Elles permettent une identification en 24 à 48 heures alors que les méthodes traditionnelles nécessitent 2 à 4 jours.

D - Sensibilité aux antibiotiques

La recherche de la sensibilité de ces *Pseudomonas* aux antibiotiques, outre son intérêt en bactériologie médicale permet d'apporter une aide au diagnostic bactériologique en évitant des confusions entre certaines espèces de *Pseudomonas*. Par exemple il est aisé d'orienter le diagnostic différentiel entre *X. maltophilia* et *P. cepacia* en rappelant que le premier est résistant à la novobiocine et sensible à la colistine et que pour *P. cepacia* c'est l'inverse.

La sensibilité de ces espèces de *Pseudomonas* est parfois paradoxale bien que présentant des caractères voisins de ceux de *P. aeruginosa* ; les données concernant ce dernier ne sont pas toujours applicables aux autres *Pseudomonas*. La sensibilité aux aminosides est variables selon les espèces, la quasi totalité des souches de *P. cepacia*, *X. maltophilia*, *P. acidovorans* sont résistantes.

La colistine est active sur ces *Pseudomonas* sauf sur *P. cepacia*, *P. pickettii*, *P. pseudomallei*. Malgré la multirésistance habituelle de ces bactéries, avec les nouvelles pénicillines (carboxypénicillines) et les céphalosporines de troisième

TABLEAU DES REACTIONS

	Durée d'incubation (en heures)	AUXANOGRAMME														
		OXYDASE		BOUILLEON URINAIRE Mob. ciliaire	KING, A	A.D.H.	Respiration des NITRATES	ACÉTAMIDE	ESQUILINE	LACTATE	GLUCOSE	TREHALOSE	MALTOSE	MANNITOL	INOSITOL	L.D.C. MEYER
		OX	BO	KA	ADH	NIT	ACET	ESC	LAC	GLU	TRE	MAL	MAN	INO	LDC	GLU oxyd.
<i>Ps. aeruginosa</i>	24 48	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Ps. fluorescens</i>	24 48	+	+	(F) F	+	d	-	-	+	+	(+) (+)	-	+	+	+	+
<i>Ps. putida</i>	24 48	+	+	(F) F	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Ps. stutzeri</i>	24 48	+	+	-	-	+	-	-	+	(+)	-	(+) +	-	-	-	+
<i>Ps. cepacia*</i>	24 48	+	+	-	-	-	+	-	(+) +	+	d	d	+	+	+	-
<i>Ps. pseudomallei</i>	24 48	+	+	-	-	+	-	d	(+) +	+	+	-	+	+	-	+
<i>Ps. maltii</i>	24 48	+	immobile	-	-	+	-	d	-	+	+	-	-	(+)	(+)	-
<i>Ps. maltophilia</i>	24 48	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	(+) +	-	-	-	-
<i>Ps. acidovorans</i>	24 48	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	d	-
<i>Ps. pseudoalcaligenes</i>	24 48	+	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alteromonas**</i>	24 48	+	+	-	-	-	-	-	+	d	-	d	-	-	-	d
<i>Flavobacterium***</i> <i>meningosepticum</i>	24 48	+	immobile	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	24 48	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	24 48	+	+	-	-	(+)	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-
<i>Alcaligenes odorans</i>	24 48	+	+	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter*</i> <i>calcoaceticus</i>	24 48	-	immobile	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	d
<i>Xanthomonas</i>	24 48	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

d = caractère variable (+) = positif lent

- * *P. cepacia* et *Acinetobacter calcoaceticus* (ADH -) alcalinisent le milieu par assimilation de 1 arginine
Acinetobacter calcoaceticus var *glucidolytica* glucose oxydatif +
Acinetobacter calcoaceticus var *lwoffi* glucose oxydatif -

** *Alteromonas putrefaciens* produit de 1 H₂S facilement décelable sur le milieu de Miger ou sur le milieu Cellobiose Inositol H₂S de la galerie Uroculture
*** Après 48 heures d incubation rechercher 1 indole avec le réactif de Kovacs

génération (excepté la cefsulodine), sont apparues de nouvelles possibilités thérapeutiques. Il est utile de souligner que certaines espèces de *Pseudomonas* possèdent une sensibilité à des antibiotiques inactifs sur *P. aeruginosa* comme le triméthoprime-sulfaméthoxazole.

BIBLIOGRAPHIE

BODEY O.P., BOLIVAR R., FAINSTEIN V., JADEJA L., « Inféodons caused by *Pseudomonas aeruginosa* », *Rev. Inf Dis.*, 1983, 5, 279-313.
GILARDI G.L., *Glucose non-fermenting Gram négative bacteria in clinical microbiology*, C.R.C. Press, 1978, West Palm Beach, Florida.
GILARDI G.L., *Non fermentative Gram négative rods : Laboratory identification and clinical aspects*. 1985. Marcel Decker Inc. éd. New York - Basel.

GUIBERT J., « Infection à Bacille pyocyanique », *Encycl. Méd. Chir.*, Paris, Maladies Infectieuses, 8025 B 50, 11-1982.

MONTEIL H., RASOAMANANJARA D., « Autres bacilles à Gram négatif et Antibiotiques », in *l'Antibiogramme* (P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon, J. Sirot éd.), 1985, MPC - Videom, pp. 127-132.

MORRISON A.J., WENZEL R.P., « Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* », *Rev. Infect. Dis.*, 1984, **6**, S 627- S 642.

PELADAN F., MONTEIL H., « Identification of *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Alcaligenes* with the API 20 NE System », *Pathol. Biol.*, 1988, **36**, 187-192.

PHILIPPON A., THABAUT A., NEVOT P., « *Pseudomonas aeruginosa* et bêta-lactamines », in *l'Antibiogramme* (P. Courvalin, F. Goldstein, A. Philippon, J. Sirot éd.), 1985, MPC - Videom, pp. 103-110.

VERON M., *Pseudomonadaceae* in *Bactériologie Médicale* 2^e éd., L. Le Minor et M. Véron, 1990, Flammarion Médecine Sciences, Paris.

A signaler : « *Pseudomonas aeruginosa*, Biology, immunology and therapy : a cefsulodin Symposium », numéro spécial de *Reviews of Infectious Diseases*, vol. 6, suppl. 3, sept-oct. 1984.

Chapitre XXm

AUTRES BACILLES NON FERMENTANTS

FLAVOBACTERIUM

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Pendant longtemps, le genre *Flavobacterium* a présenté une très grande hétérogénéité : il rassemblait en effet des bacilles à Gram négatif ou positif, immobiles ou mobiles, à ciliature péritriche, bacilles dont la seule propriété commune était la pigmentation jaune de leurs cultures.

Dans la dernière édition du « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », 1984, le genre *Flavobacterium* a été redéfini comme regroupant « des bacilles à Gram négatif, de 0,5 à 1-3 μm (en milieu liquide, présence de bacilles de longueur supérieure à 5 μm), ne formant pas de spores, aérobies stricts, (métabolisme de type strictement respiratoire), oxydase (+), catalase (+), immobiles et dépourvus de mobilité par glissement, et n'essaimant pas comme les *Cytophaga* ».

Les souches de l'environnement croissent entre 5 et 30°C, la plupart des souches d'origine humaine se développent également à 37°C. Les colonies sont translucides, parfois opaques, rondes, de 1 à 2 mm de diamètre, légèrement ou peu bombées, lisses, brillantes. Les colonies sont pigmentées en jaune, jaune orangé voire orangé (pigment non diffusible, dont la production est favorisée par une température de 15 à 20°C, par la lumière du jour et par l'emploi de milieux à base de caséine, de lait ou d'amidon) ou ne sont pas pigmentées. Chimio-organotrophes, la majorité des souches sont protéolytiques, hydrolysent la gélatine et la caséine, produisent une DNase. Les nitrates ne sont généralement pas réduits. Différentes espèces produisent de l'indole.

Les *Flavobacterium* ont pour habitat le sol et l'eau : on les rencontre également dans les viandes crues, le lait et divers aliments, dans l'environnement hospitalier et dans divers prélèvements d'origine humaine.

La teneur en bases (G + C %) des ADN est comprise entre 31 et 42 moles %.

F. brève a été proposé par HOLMES et OWEN comme espèce-type du genre *Flavobacterium* en remplacement de *F. aquatile*. Selon ces auteurs, *F. aquatile* n'est pas représentatif de l'ensemble des espèces du genre *Flavobacterium* et s'apparente davantage aux *Cytophaga* qu'aux *Flavobacterium*.

Les autres espèces de *Flavobacterium* et les souches types correspondantes sont respectivement :

F. balustinum (syn. *Flavobacterium* du groupe IIb), *F. meningosepticum* espèce la plus importante sur le plan médical, *F. odoratum*, *F. multivorum* (syn. groupe IIk, biovar 2), *F. spiritovorum*.

II - F. MENINGOSEPTICUM

A - Morphologie et caractères cultureux

Bacilles à Gram négatif, courts, parfois même très courts (0,4-0,5 x 0,7-2 u.m), fins ou assez fins, avec tendance au polymorphisme : présence de formes longues et souvent flexueuses, les longs bacilles sont d'autant plus nombreux que les cultures en bouillon sont plus âgées.

Près de 20 % des souches de *F. meningosepticum* ne croissent pas sur le milieu de Drigalski ; les autres s'y développent en donnant des colonies lactose (-), rondes, d'environ 1,5 à 2 mm après 48 h à 30°C. La grande majorité des cultures sont apigmentées ou apparaissent de couleur rosé très pâle, lorsqu'on les prélève à l'anse de platine ; les autres sont jaune-orangé pâle. Sur les milieux T.S.A. et Hajna-Kliger, certaines cultures de *F. meningosepticum* présentent un aspect muqueux.

B - Signification clinique et sensibilité aux antibiotiques

Chez le nouveau-né, le plus souvent prématuré, *F. meningosepticum* est l'agent de septicémie et de méningite gravissimes, avec issue fatale fréquente ou laissant d'importantes séquelles (hydrocéphalie). Chez l'adulte, les infections sont essentiellement iatrogènes.

F. meningosepticum est résistant à de nombreux antibiotiques habituellement actifs sur les bacilles à Gram négatif (bêta-lactamines, aminosides, tétracycline, colistine, triméthoprime, furanes...) et le plus souvent présente une sensibilité « paradoxale » à des antibiotiques en principe seulement actifs sur des bactéries à Gram positif (novobiocine, vancomycine, érythromycine, spiramycine, lincomycine, clindamycine...). Le genre *Flavobacterium* représente une grande hétérogénéité du point de vue de l'antibiotype : certaines souches sont sensibles aux uréidopénicillines, à la ciprofloxacine, au co-trimoxazole, on rencontre des souches résistantes à l'imipénème.

III - LES AUTRES ESPÈCES DE FLAVOBACTERIUM

F. odoratum, *F. brève* et *F. IIf* sont quelquefois isolées des urines, *F. IIf* des organes génitaux, *F. odoratum* de pus divers, et *F. IIf* des cathéters, des seringues, du matériel à usage médical ou chirurgical en milieu hospitalier.

La sensibilité de ces espèces est voisine de celle de *F. meningosepticum* à l'exception de *F. odoratum* qui est très résistant.

ACHROMOBACTER - ALCALIGENES

La position taxonomique des espèces appartenant à ces genres est encore incertaine et la description actuelle du Bergey's Manual ne permet pas donner une présentation pratique de ces espèces que l'on rencontre dans certains produits pathologiques ou matériels hospitaliers.

Leur diagnostic différentiel se pose avec diverses espèces : *Bordetella bronchiseptica*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *Agrobacterium*.

Nous nous limiterons à une description simplifiée de ces espèces sans tenir compte des incessants remaniements taxonomiques en raison de leur intérêt limité au diagnostic différentiel en bactériologie clinique de routine.

A - *Alcaligenes*

L'espèce-type serait *A. faecalis* (Castellani et Chalmers, 1919). Le genre *Alcaligenes* regroupe des bacilles à Gram négatif, oxydase (+), mobiles par une ciliature péritriche. Mais il faut souligner que cette ciliature peut être « dégénérée » ne laissant subsister qu'un ou deux flagelles latéraux ou polaires. La coloration des flagelles (Méthode de Rhodes) est indispensable pour orienter le diagnostic et éviter la confusion avec les *Pseudomonas*. Les espèces dulçaquicoles hétérotrophes sont seules considérées :

- *A. faecalis*, (*A. odorans* assimilé à *A. faecalis*)
- *A. denitrificans* (*A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* et subsp. *xylosoxidans* assimilé à *Achromobacter xylosoxidans*)
- *A. piechaudii*.

Les espèces marines et autotrophes facultatives ne présentent pas d'intérêt en Bactériologie Médicale.

Alcaligenes, isolé de l'eau et du sol, est fréquent dans l'environnement hospitalier. Leur pouvoir pathogène naturel est nul, mais en raison de leur résistance aux antibiotiques et antiseptiques usuels, ces germes peuvent être à l'origine de contaminations de solutions médicamenteuses et de surinfections localisées en milieu hospitalier.

Un diagnostic bactériologique simplifié peut être établi sur le schéma suivant (complété par un auxanogramme) :

Test	<i>A. faecalis</i>	<i>A. odorans</i>	<i>A. denitrificans</i>
Respiration NO ₂			+
Respiration NO ₃	-	+	+
TDA		+	

Absence de pigment, de gélatinase, de décarboxylases.

La sensibilité aux antibiotiques est peu différente de celle des *Pseudomonas* et l'action des aminosides est variable.

B - *Achromobacter*

Le genre *Achromobacter* groupe des bacilles à Gram négatif, oxydase (+), à ciliature péritriche, oxydant divers hydrates de carbone et ne produisant pas de 3-cétolactose à partir du lactose. La classification de ce genre est controversée.

Deux espèces sont reconnues par le « Center for Disease Control » (CDC) : *A. xylosoxidans* et *Achromobacter* sp, groupe Vd.

L'habitat naturel de ces germes est mal connu. Ils feraient partie de la flore endogène du gros intestin et sont isolés de différentes sources de l'environnement et hospitalières. Ils peuvent être isolés dans divers produits pathologiques et parfois ont une réelle signification clinique lors d'infections nosocomiales (méningites, bactériennes,...) chez des malades immunodéprimés.

Le diagnostic bactériologique retient l'oxydation du xylose par 99 % des souches d'*A. xylosoxidans* et l'hydrolyse de l'urée par *Achromobacter* sp groupe Vd.

Achromobacter est sensible aux carboxypénicillines, aux acyluréidopénicillines (aziocilline, pipéracilline), à certaines céphalosporines de troisième génération (céfopérazone, ceftazidime,...) et au cotrimoxazole.

AGROBACTERIUM

Ce genre a longtemps été considéré comme pathogène des plantes (par exemple *Agrobacterium tumefaciens*) : agent de tumeur du collet (crown gall), prolifération des racines (hairy root).

L'habitat de ces bactéries est le sol. Une espèce pourrait avoir un intérêt médical : *A. radiobacter* (non pathogène pour les plantes).

Les souches hospitalières isolées présentent différents biotypes, avec trois caractères principaux : esculine (+), uréase (+), ONPG (+). Ce sont des bacilles mobiles à ciliature péritriche souvent dégénérée avec des flagelles peu nombreux.

Ils peuvent contaminer et être isolés dans divers produits pathologiques, leur signification clinique est difficile à établir même lors d'hémoculture positive.

XANTHOMONAS

Le genre *Xanthomonas* fut créé pour regrouper des bactéries phytopathogènes pigmentées en jaune voisines des *Pseudomonas*. Ce genre contenait une soixantaine d'espèces dont la distinction se faisait sur la base de leur pouvoir pathogène vis-à-vis d'une plante donnée.

La dernière édition du « Bergey's Manual » reconnaît cinq espèces principales : *X. campestris*, *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. axonopodis*, *X. ampelina*. *Pseudomonas maltophilia* a été transféré dans le genre *Xanthomonas*.

A - Morphologie

Bacilles à Gram négatif, mobiles par un cil polaire monotriche.

B - Caractères cultureux

Bactéries chimio-organotrophes, apparemment peu exigeantes mais pas absolument prototrophes. Température optimum 25 à 30°C. Les *Xanthomonas* produisent un pigment jaune, mais il y a des exceptions. A l'origine, défini comme étant de nature caroténoïde, il s'agirait en fait de xanthomonadine = aryl-polyène brome, soluble dans les solvants organiques. Sur gélose nutritive contenant du glucose, certaines souches produisent un « slime » abondant.

C - Caractères biochimiques

Oxydase (-) parfois faiblement positive

Catalase (+)

Fréquemment lipolytiques, protéolytiques, pectolytiques et/ou amylolytiques.

Les caractères biochimiques simples de *X. maltophilia* sont donnés dans le tableau du chapitre 22 *Pseudomonas*.

D - Intérêt médical

La signification en bactériologie clinique de l'isolement de *Xanthomonas* phytopathogènes est encore obscure. Il s'agit surtout d'un problème de diagnostic différentiel pouvant éventuellement se poser au laboratoire. L'implication de ces *Xanthomonas* comme bactéries opportunistes reste à démontrer.

X. maltophilia a été décrit en 1961 par Hugh et Ryschenkow. Malgré ses exigences nutritives particulières et notamment son auxotrophie vis-à-vis de la méthionine, cette bactérie ubiquitaire est isolée à partir de légumes, de bananes, de graines de coton, de gousses de haricots, de plants de tabac, des eaux même potables, des eaux stagnantes, des eaux d'égouts, des eaux de ruisseaux ou de rivières, d'eaux provenant de nappes phréatiques, de lait contaminé, du sol dans les zones pétrolifères.

Dans l'environnement hospitalier on le rencontre dans l'eau distillée, l'eau des incubateurs, des nébulisateurs, des humidificateurs. *X. maltophilia* est le deuxième bacille non fermentant apparenté aux *Pseudomonas* isolé par ordre de fréquence dans un laboratoire de bactériologie médicale après *P. aeruginosa*. Les sources habituelles d'isolement chez l'homme sont les voies aériennes, les plaies, le sang, les urines mais *X. maltophilia* peut se trouver en de multiples autres sites : les liquides, d'ascite, péricardiques, pleuraux, LCR, la lymphe, les ulcères de jambe, les solutés de dialyse... C'est habituellement un germe commensal qui fait partie de la flore transitoire des malades hospitalisés, il devient plus fréquent dans la mucoviscidose. *X. maltophilia* est l'agent d'infections opportunistes : endocardites, septicémies, pneumonies lobaires, bronchopneumonies, pneumonies d'aspiration, infections urinaires, conjonctivites, méningites, surinfections de plaie, suppurations diverses.

Vingt-six sérotypes 0 ont récemment été décrits et pourraient servir aux études épidémiologiques.

X. maltophilia est souvent caractérisé par une résistance naturelle élevée vis-à-vis de bêta-lactamines lié à une faible perméabilité membranaire. Il possède des bêta-lactamases chromosomiques et plasmidiques. L'existence d'au moins 2 bêta-lactamases chromosomiques inductibles (L1 Zn - pénicillinase et L2 - céphalosporinase contenant une serine dans son site actif) assure déjà l'hydrolyse de plusieurs bêta-lactamines rendant difficile le choix d'une antibiothérapie.

Il faut retenir qu'il est toujours résistant à l'imipénème. Les quinolones de 2^e génération peuvent être actives mais de façon variable.

BIBLIOGRAPHIE

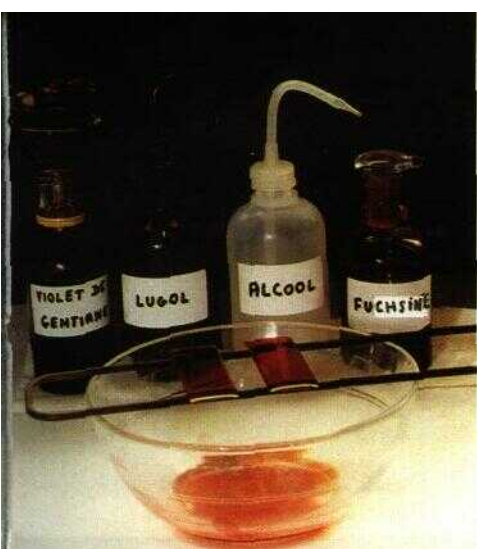
- ARAFAT W., JEHL F., THABAUT A., MONTEIL H., « Bêta-lactamase de *Pseudomonas maltophilia* : distribution et purification », *Méd. Mal. Infect.*, 1988, **1**, 829-834.
- GILARDI G.L., « Glucose non-fermenting Gram négative bacteria in Clinical microbiology », *CRC Press*, 1978, West Palm Beach, Florida.
- IGRA-SIEGMAN Y., CHMEL H., COBBS C., « Clinical and laboratory characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* infection », *J. Clin. Microbiol.*, 1980, **11**, 141-145.
- MARSHALL W.F., KEATING M.R., ANHALT J.P., STECKELBERG J.M., « *Xanthomonas maltophilia* : an emerging nosocomial pathogen. *Mayo Clin Proc.*, 1990, **64**, 1097-1104.
- MONTEIL H., RASOAMANANJARA D., JEHL F. « Sensibilité aux antibiotiques actuels de *Flavobacterium* sp et *Pseudomonas* sa, bactéries opportunistes d'avenir. *Méd. et Mal. Infect.*, 1986, **1**, 18-23.

MONTEIL H., JEHL F. « Activité comparée de ticarcilline - acide clavulanique et de diverses bêta-lactamines sur *Pseudomonas maltophilia* », *Pathol. Biol.*, 1987, 35, 805-808.

RASOAMANANJARA D., KOROSÉC B., MONTEIL H., « Classification and identification of *Flavobacterium* species by carbon-sources utilization », *J. Clin. Microbiol.*, 1987, 25, 1285-1290.

REVERDY M.E., FRENEY J., FLEURETTE J., *et al.*, « Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans* », *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **19**, 140-143.

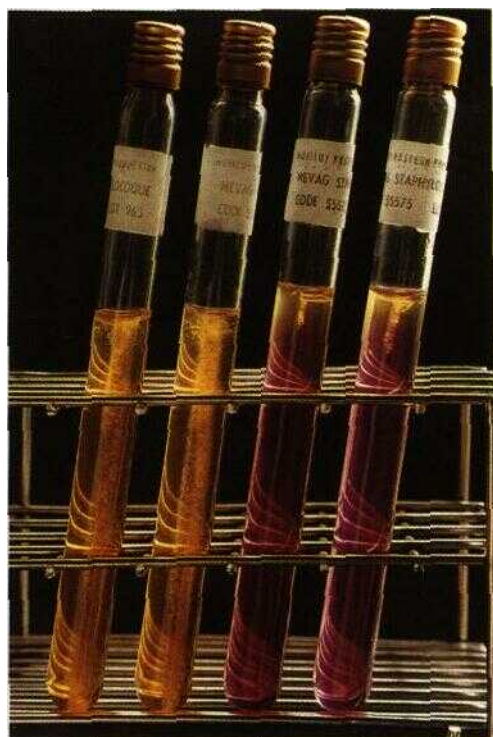
RICHARD C., MONTEIL H., « Isolement, identification, signification **clinique des espèces du genre *Flavobacterium*** », *Ann. Biol. Clin.*, 1983, **41**, 187-198.



1



2

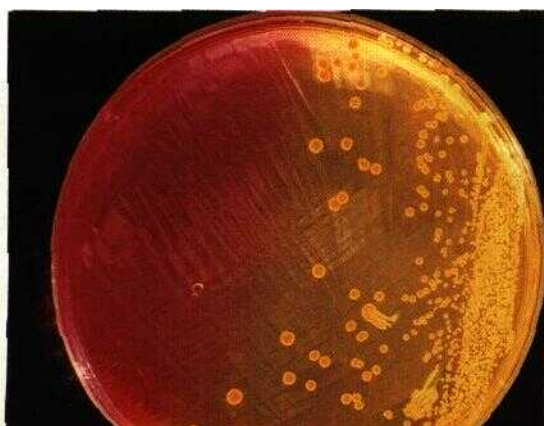


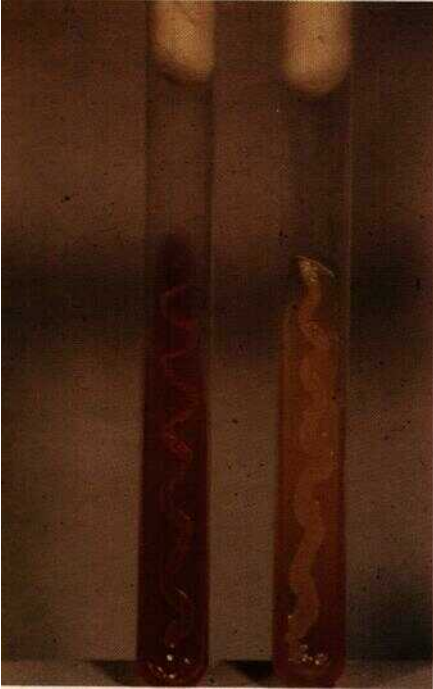
3

1. Colorants nécessaires pour effectuer une coloration de Gram.
2. Mise en évidence du type de métabolisme respiratoire d'une souche. Les quatre souches présentées sont de gauche à droite: aérobic, micro-aérophile, aéro-anaérobic avec production de gaz, anaérobic.
3. Milieu MEVAG pour étude du métabolisme respiratoire des Staphylocoques. Tubes de gauche: Staphylocoque, aéro-anaérobic; tubes de droite: Microcoque, aérobic stricte.
4. Différents types de pigments produits par des colonies de Staphylocoques: blanc, citrin, doré.
5. Colonies de *Staphylococcus aureus* acidifiant le milieu de Chapman.

4

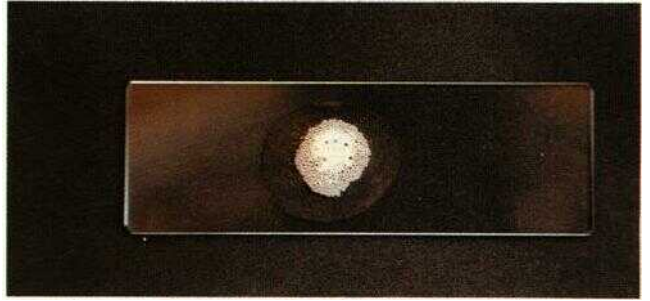
5





6

7



8



6. Milieu de Chapman en tube. A gauche, souche Chapman négatif; à droite, souche Chapman positif.

7. Mise en évidence de la catalase; production des bulles d'oxygène par une colonie mise en contact avec de l'eau oxygénée.

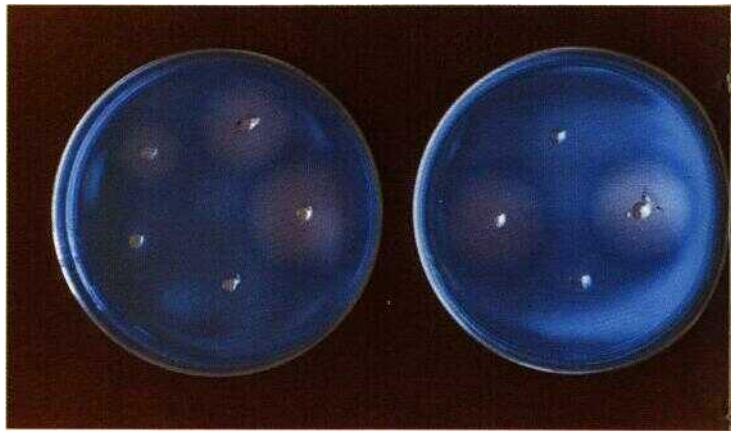
8. A gauche, souche de *S. aureus* à coagulase positive; à droite souche de *S. epidermidis* à coagulase négative.

9. Mise en évidence de la thermo-nucléase par un halo autour des puits des souches productrices.

10. Mise en évidence de la DNase. Éclaircissement de la gélose à l'ADN autour de la souche positive ensemencée en strie sur une gélose à l'ADN.

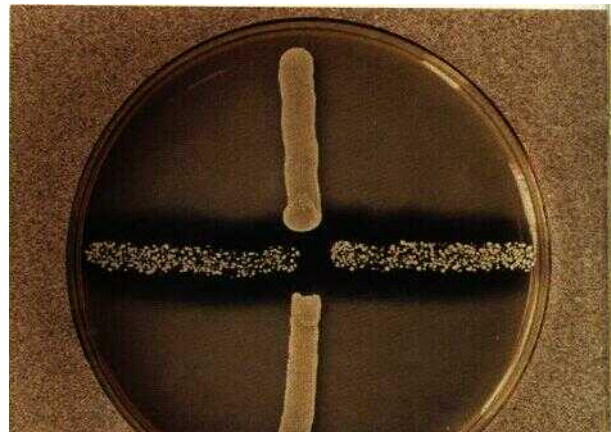
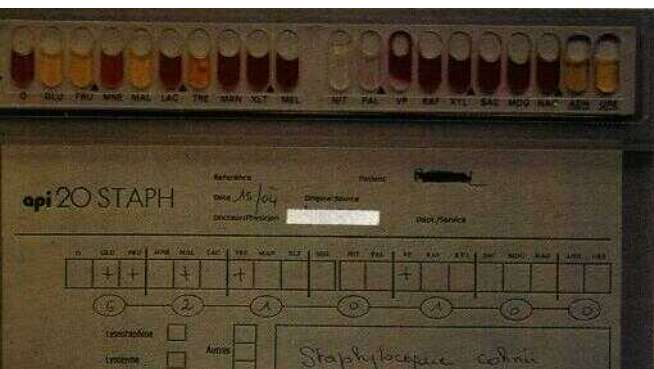
11. Galerie API-STAPH. Souche de *Staphylococcus cohnii*.

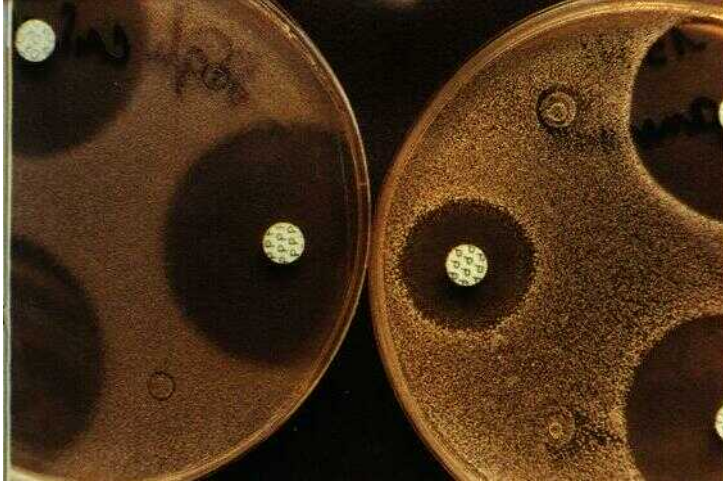
9



11

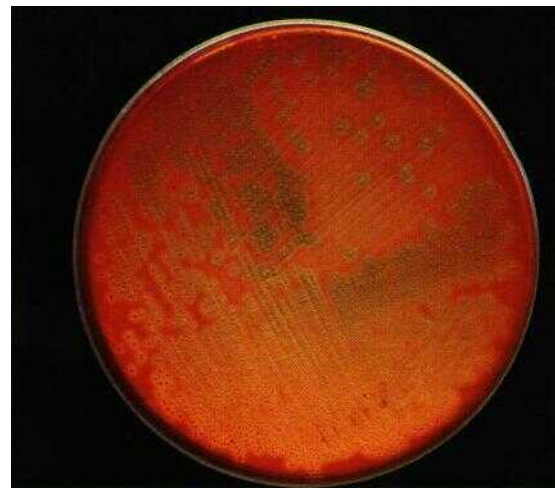
1C





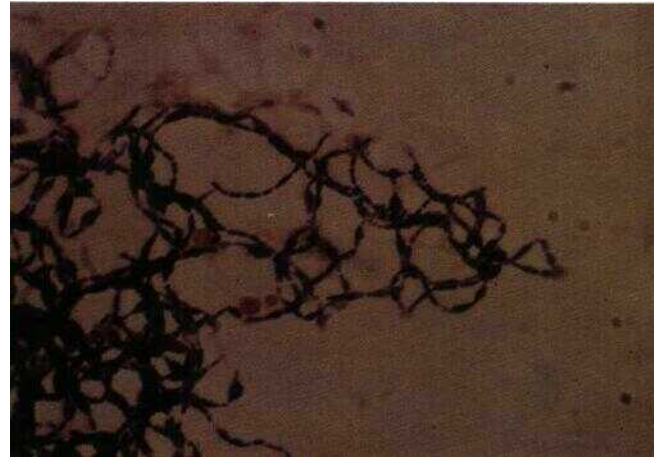
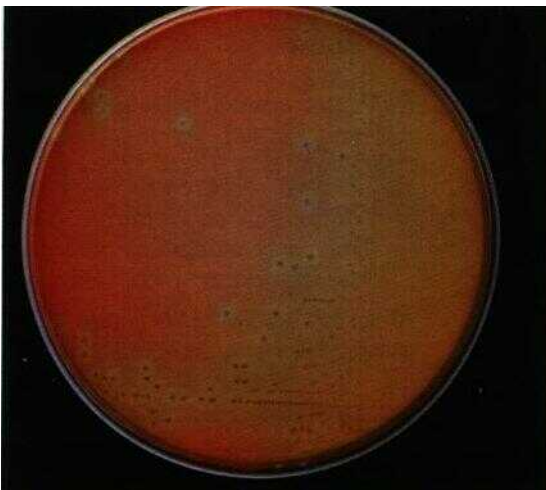
14

12



13

15



12. Souches de *S. aureus*. Zone d'inhibition autour du disque de pénicilline. La souche de gauche est sensible. La souche de droite produit une pénicillase. Observer la différence de bordure des zones d'inhibition.

13. Colonies de Streptocoque. Hémolyse B.

14. Colonies de Streptocoque. Hémolyse a viridans.

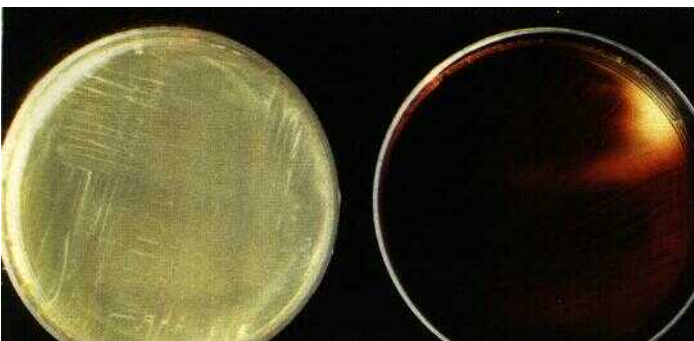
15. Streptocoque déficient. Coloration de Gram. Noter l'irrégularité de la taille et de la forme des corps bactériens.

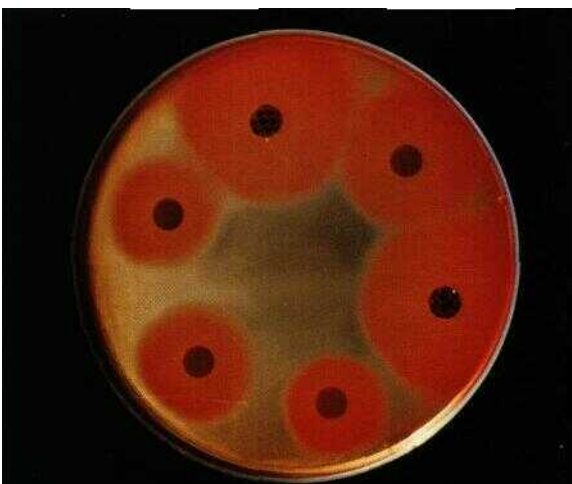
16. Gélose bile-esculine. A gauche, souche négative. A droite, souche positive, noircissement du milieu.

17. Noircissement des colonies de *Enterococcus faecalis* sur gélose au tellurite de potassium.

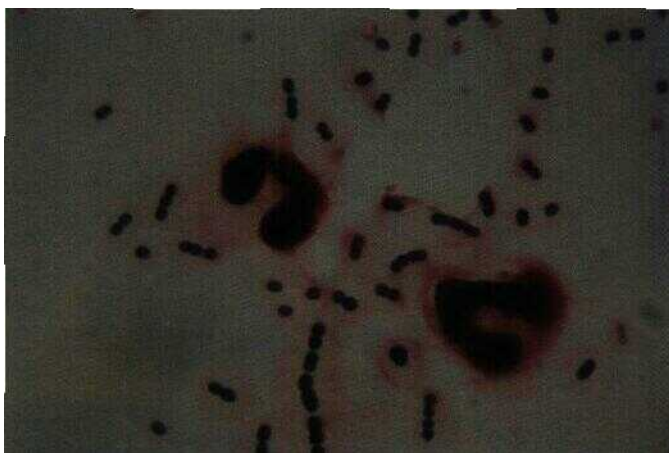
16

17





18

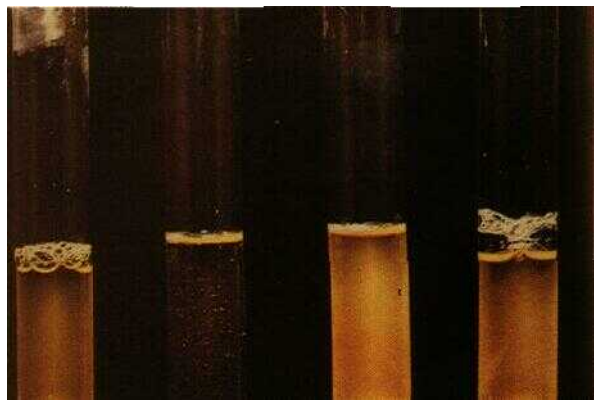


19

20



22



18. Antibiogramme d'une souche de Streptocoque 6-hémolytique.

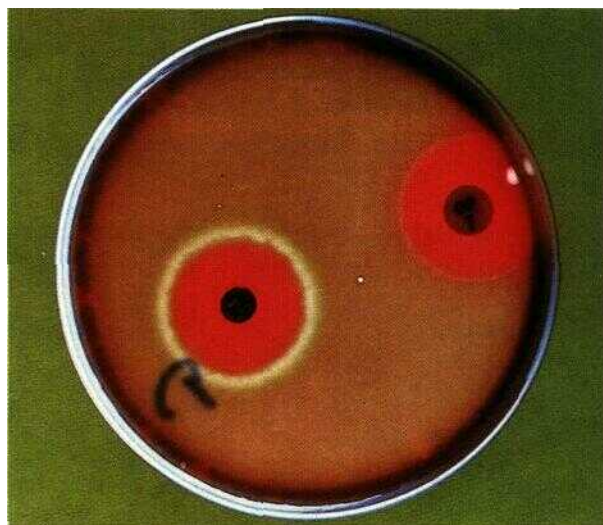
19. Coloration de Gram. *Streptococcus pneumoniae* dans un liquide céphalo-rachidien.

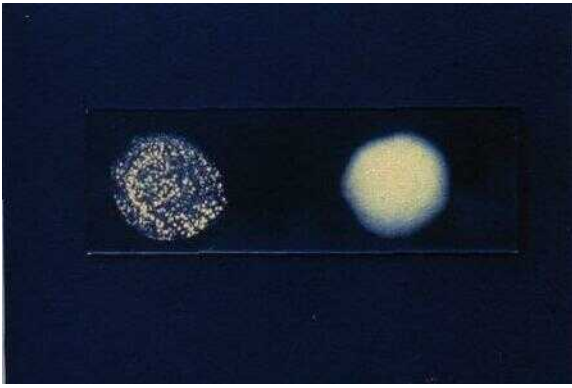
20. Colonies de *S. pneumoniae* sur gélose au sang, après 18 heures d'incubation.

21. Hémolyse bêta des colonies de pneumocoque en présence de vancomycine (VA) en anaérobiose et inhibition de la croissance en présence d'optochine.

22. Lyse d'une culture de *S. pneumoniae* par la bile. Éclaircissement du bouillon de culture.

21





23



24

23. Agglutination d'une culture de *S. pneumoniae*.

24. Coloration de Gram. *Neisseria gonorrhoeae* dans un pus urétral.

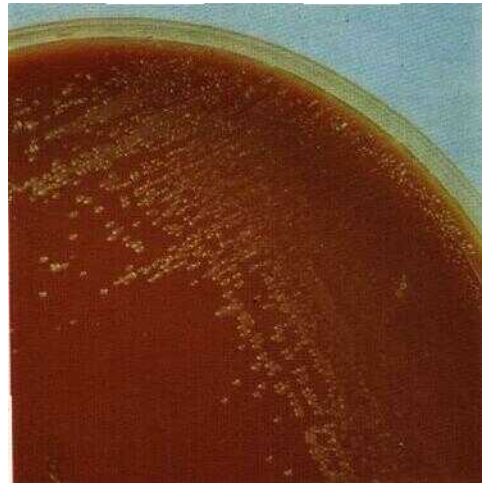
25. Colonies de *N. gonorrhoeae* sur gélose chocolat.

26. Mise en évidence de l'oxydase.

27. Disque de céphalosporine chromogène pour mise en évidence d'une bêta-lactamase.

28. Galerie miniaturisée Diagnostics-Pasteur pour identification des *Neisseria* et *Branhamella*.

25



26



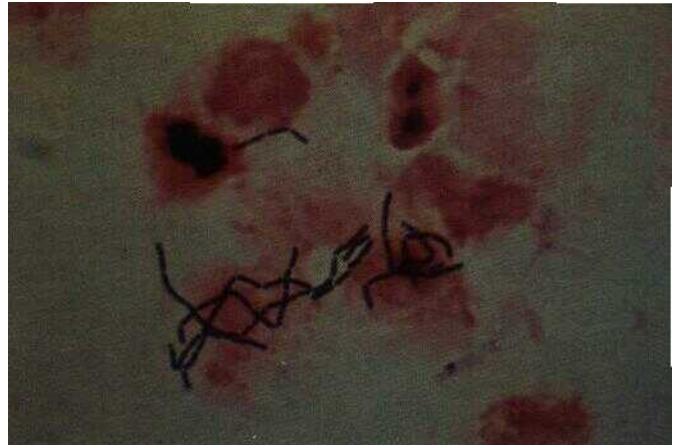
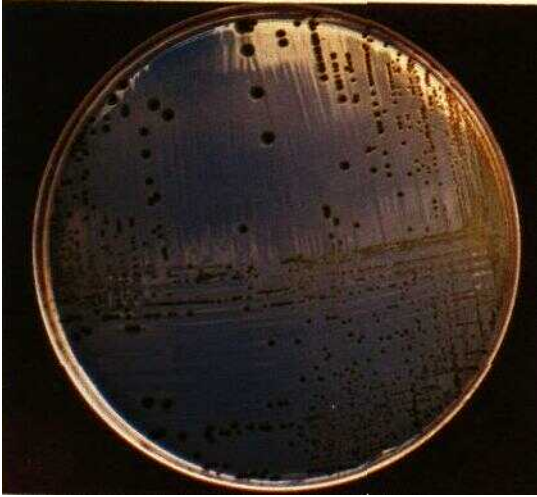
27



28



29



30

29. Colonies d'*Acinetobacter* sur gélose de Drigalski.

30. Coloration de Gram. Souche de *Listena* dans un liquide céphalo-rachidien.

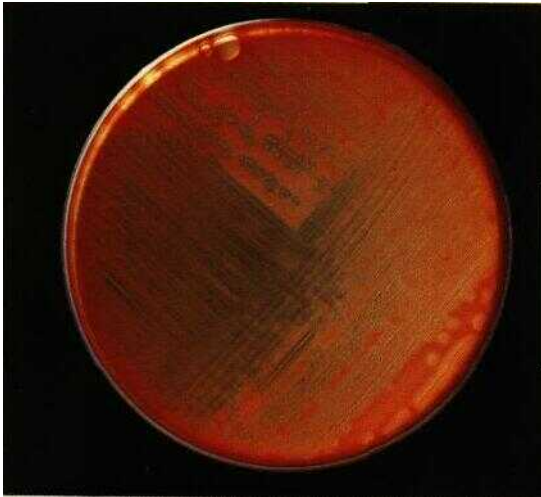
31. Colonies de *Listena* sur gélose au sang.

32. Colonies de *Bacillus* sur gélose nutritive.

33. Coloration de Gram. *Bacillus anthracis* dans un liquide céphalo-rachidien.

34. *Vibrio parahaemolyticus*. phénomène de Kanagawa.

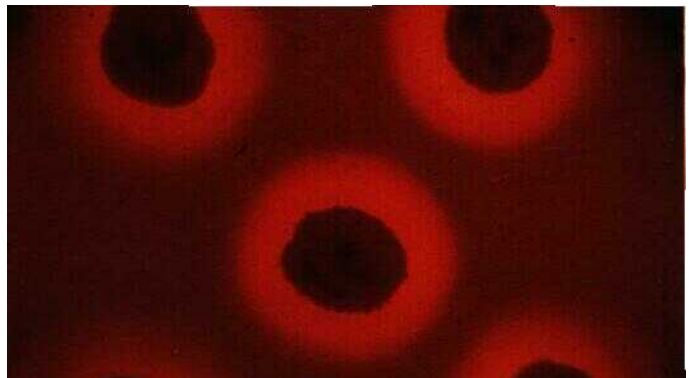
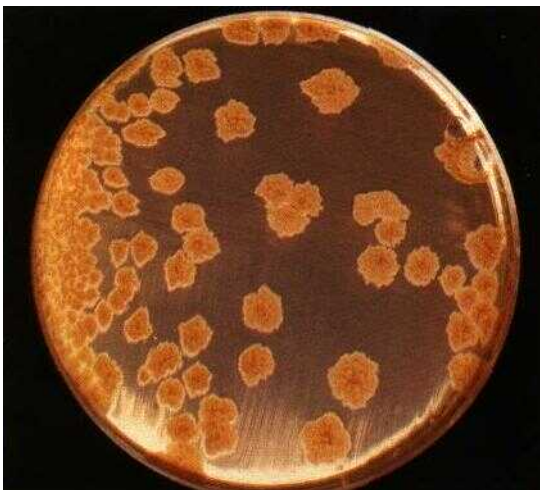
31

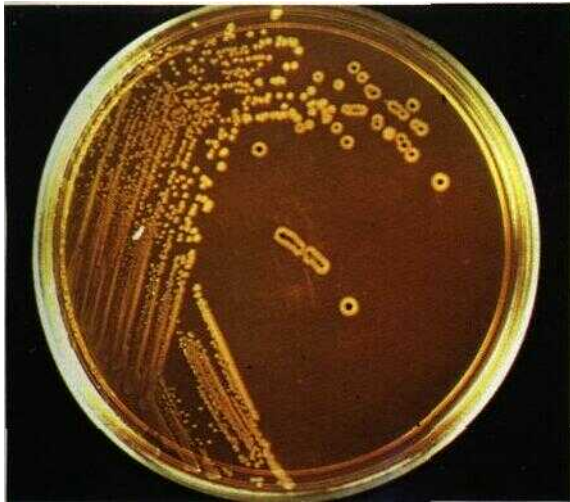


33

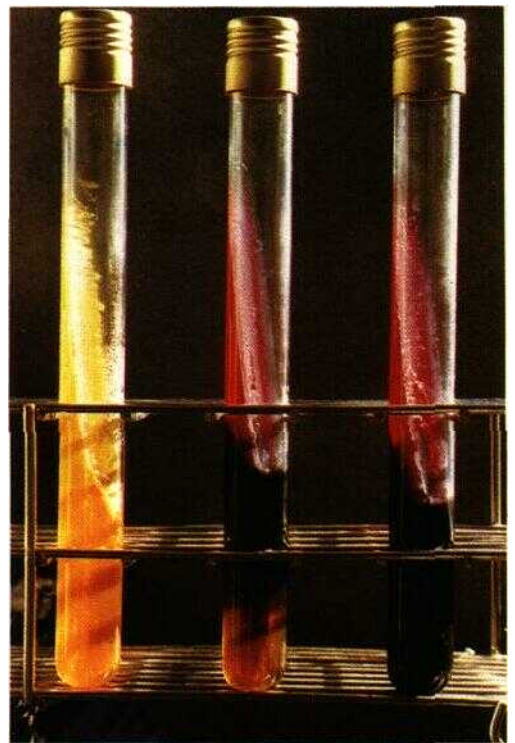


32

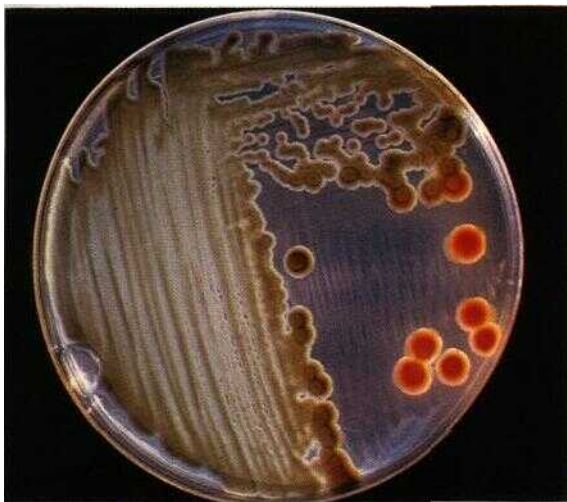




35



36



37

35. Colonies de *Salmonella enteritidis* sur gélose SS.

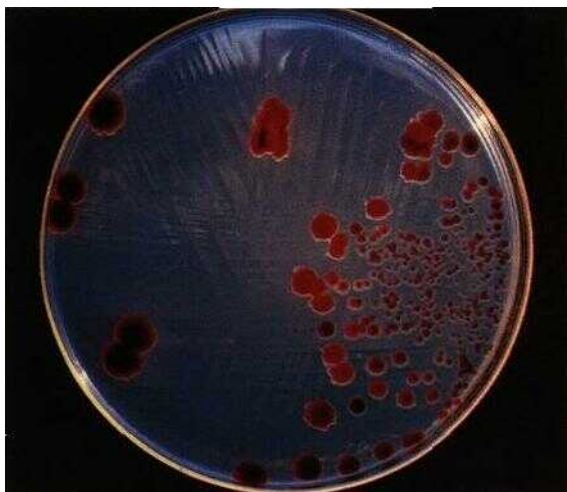
36. Milieu de Kligler-Hajna. De gauche à droite: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*.

37. Colonies muqueuses de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose de Drigalski.

38. Colonie de *Serratia pigmentées* en rouge sur gélose de Drigalski.

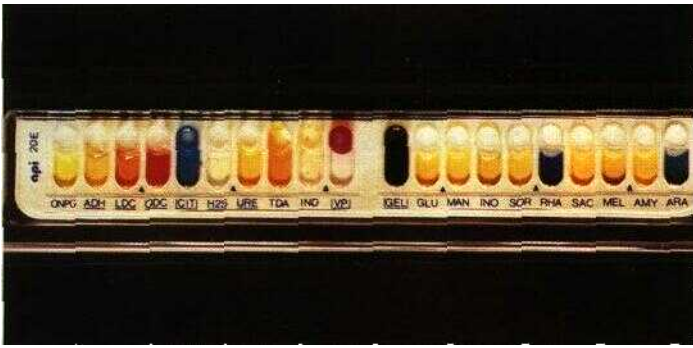
39. Différents types de colonies sur gélose Hektoen.

38



39





40

40. *Serratia marcescens*. Galerie API -20E.

41. Antibiogramme de *Serratia*. Aspect caractéristique avec présence de colonies dans la zone d'inhibition autour du disque de colistine.



41

42. *Proteus*. Essaimage en nappe sur la gélose à partir du point d'inoculation au centre de la boîte.

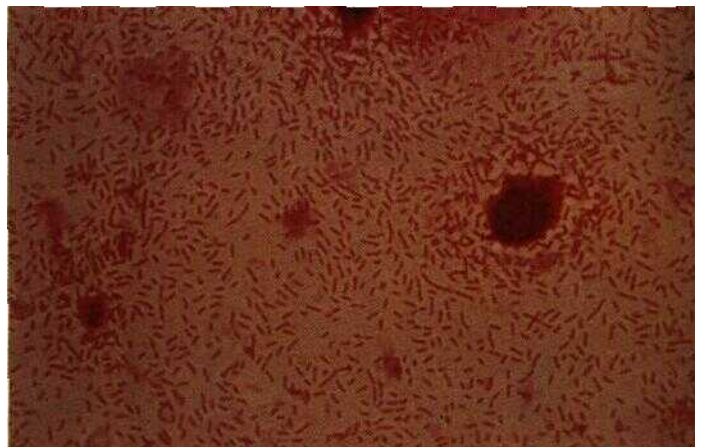
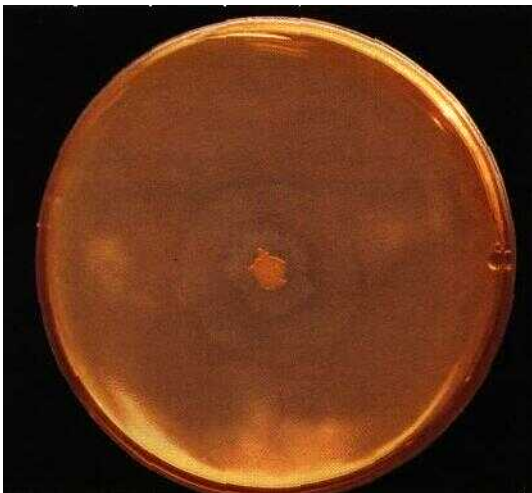
43. Colonies de *Yersinia* sur gélose CIN.

44. Selles de cholérique. Coloration de Grain.

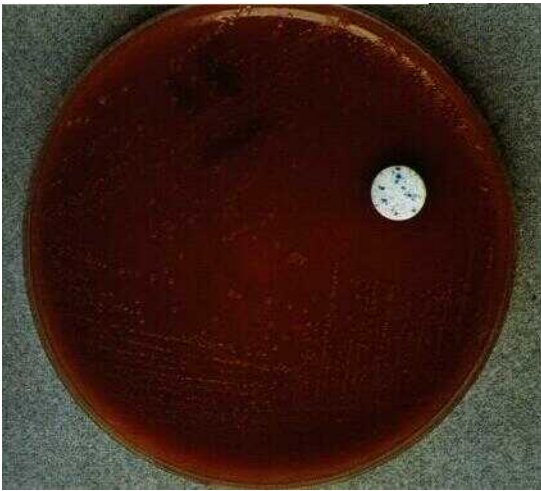
43



42



44



45



46

47

45 Inhibition d'une culture de *Pasteurella multocida* autour d'un disque de composé vibrostatique

46. Souche de *Pasteurella multocida*. Galerie API - 20E.

47. Souche de *Streptobacillus moniliformis* dans un bouillon d'hémoculture

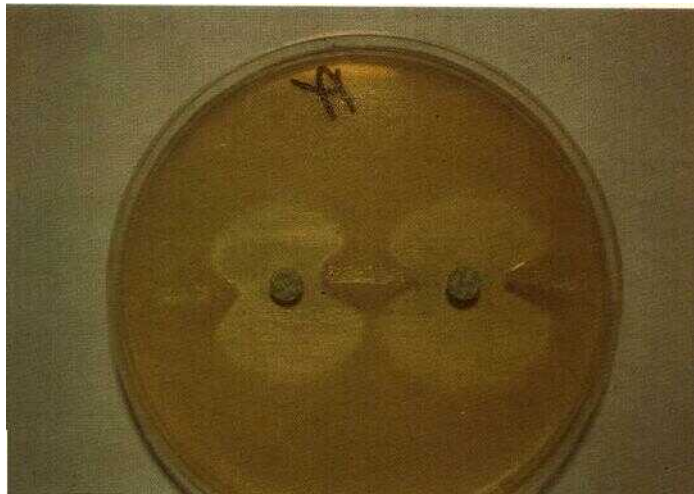
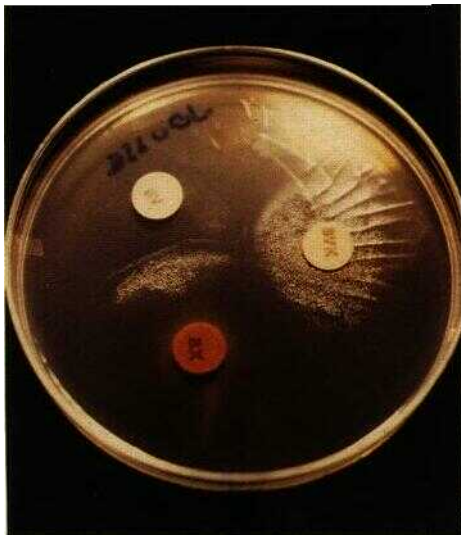
48 Mise en évidence des besoins en facteurs de croissance d'une souche de *Haemophilus influenzae*

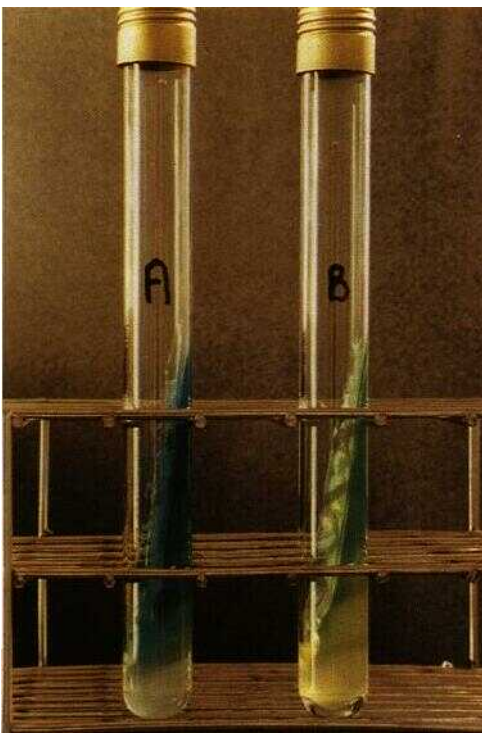
49 Détection d'une bêta-lactamase d'une souche de *Haemophilus mfluenzae* ensemencée en stne.



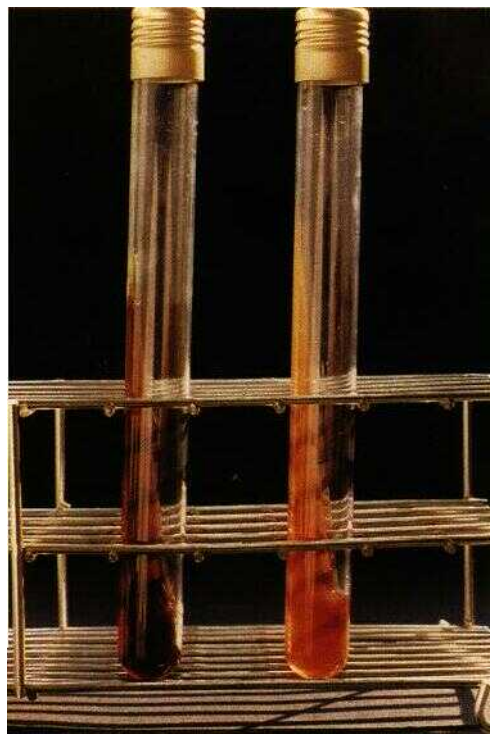
48

49





50



51

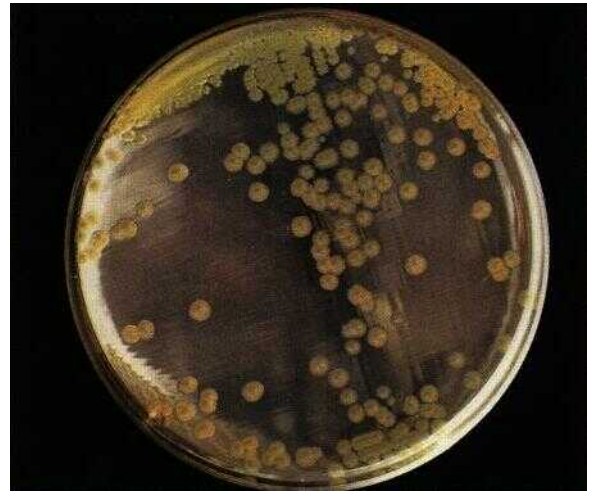
50. Souche de *Pseudomonas aeruginosa* Pigments sur milieux de King A et B.

51. Souche érythroène de *P. aeruginosa*.

52. Colonies de *P. aeruginosa* sur gélose nutritive.

53. Galerie *Pseudomonas* (Diagnostics-Pasteur).

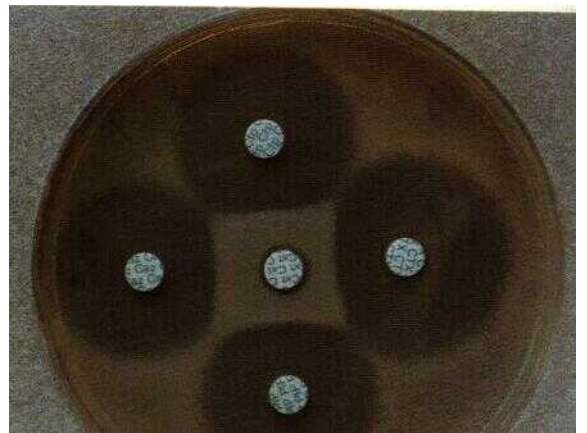
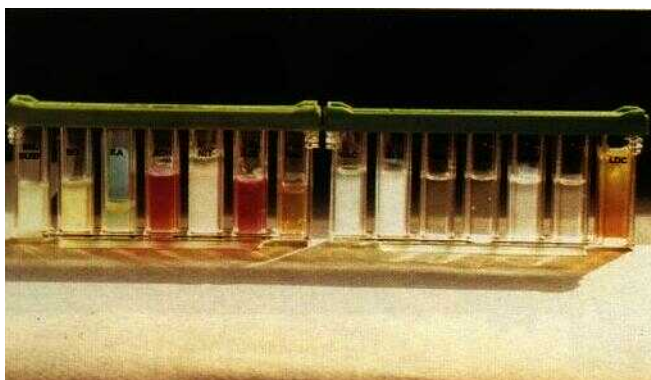
54. Antibiogramme de *P. aeruginosa*. Noter l'effet inducteur de la céfoxitine (disque du centre) qui entraîne une diminution du rayon des zones d'inhibition.

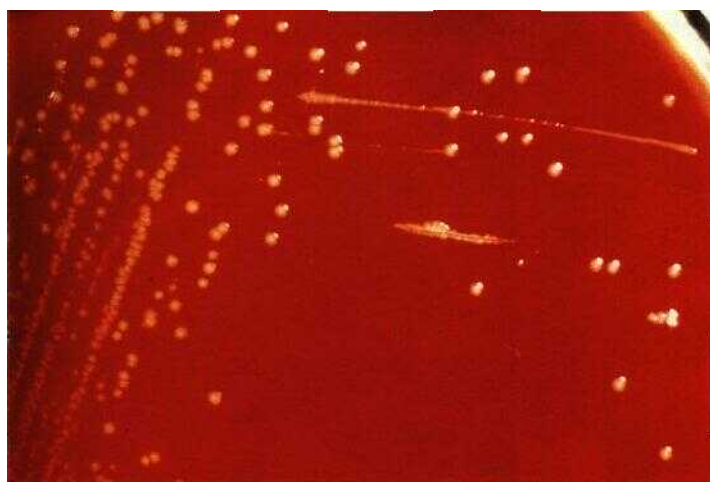


52

53

54





55



56



57

55. Colonies de *Campylobacter* sur milieu sélectif.

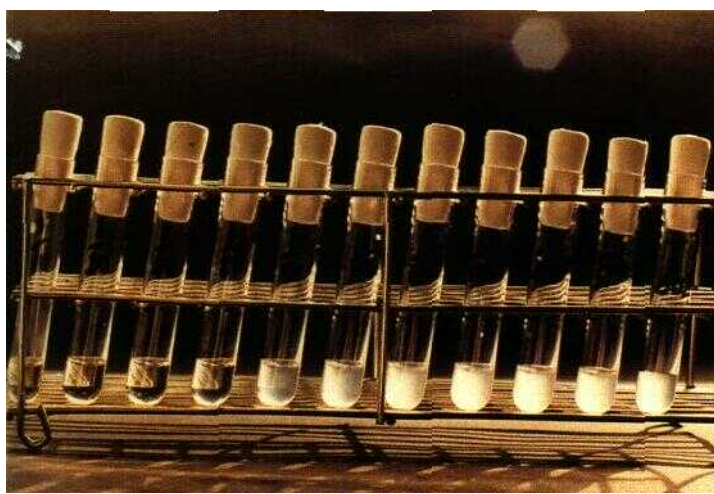
56. Coloration de Gram. Culture de *Campylobacter*.

57. Hémoculture sur flacon de Castaneda pour recherche de *Brucella*.

58. Sérodiagnostic de Wright.

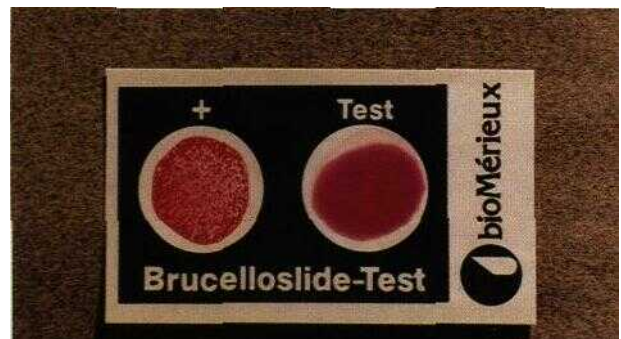
59. Épreuve à l'antigène tamponné.

60. Colonies de *Legionella* après 48 heures d'incubation sur gélose BCYE.



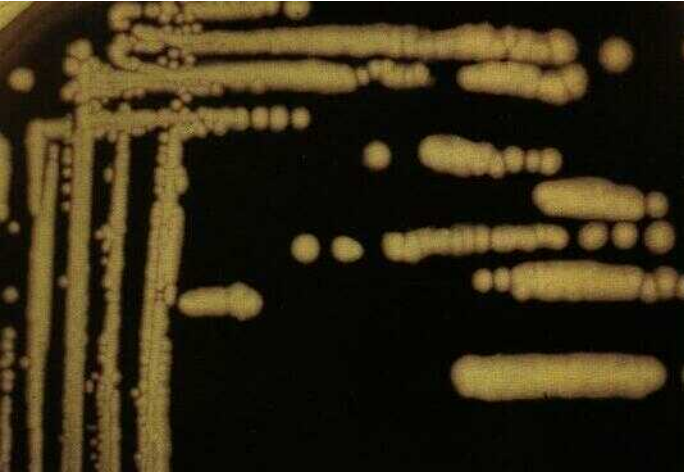
58

60



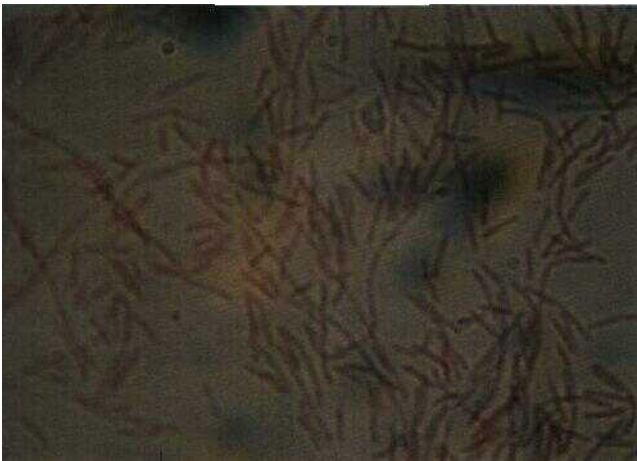
59





61

61



63

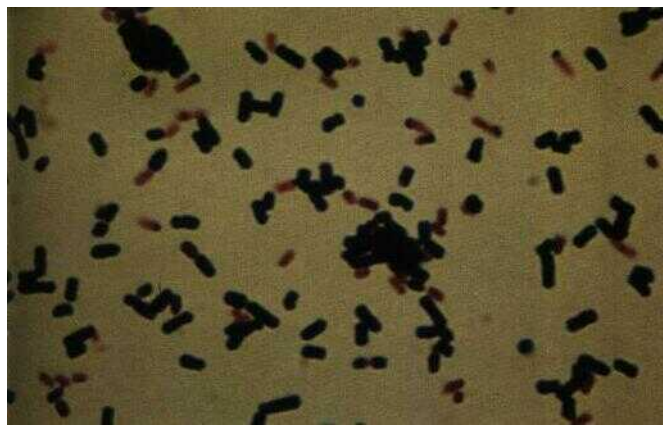
- 61. Colonies de *Legionella*.
- 62. Coloration de Gram. *Legionella* après subcultures.
- 63. Jarre pour incubation en anaérobiose.
- 64. Enceinte pour manipulation en anaérobiose.
- 65. Milieux de transport pour produits pathologiques destinés à la recherche de bactéries anaérobies.

65

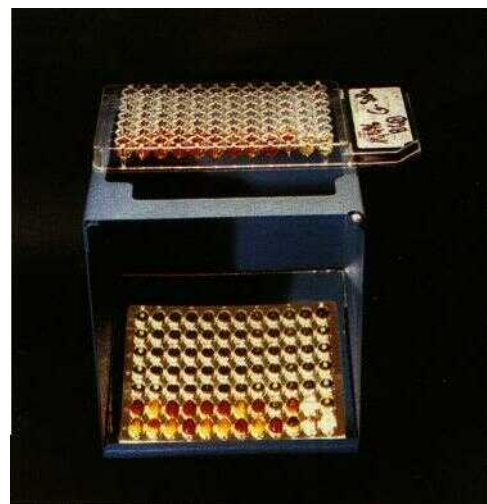


64

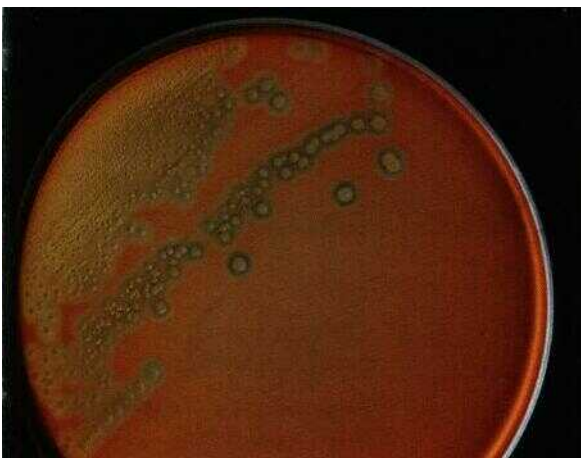




67



66



68

66. Microplaque pour identification et étude de la sensibilité des anaérobies aux antibiotiques.

67. Coloration de Gram. *Clostridium perfringens*. Noter la décoloration de certains corps bactériens.

68. Colonies de *C. perfringens* sur gélose au sang.



69

69. Colonies de *C. perfringens* sur gélose Columbia.

70. Colonies de *Clostridium difficile*.

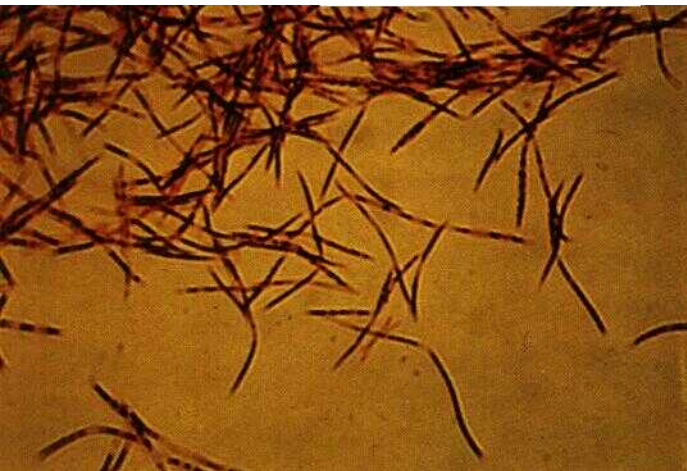
71. Coloration de Gram: *Fusobacterium mortiferum*.

70

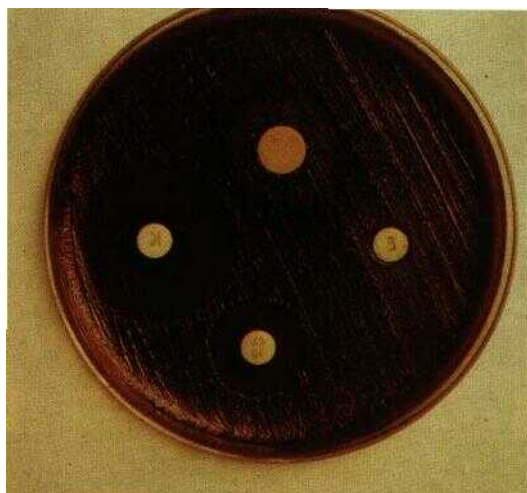


71

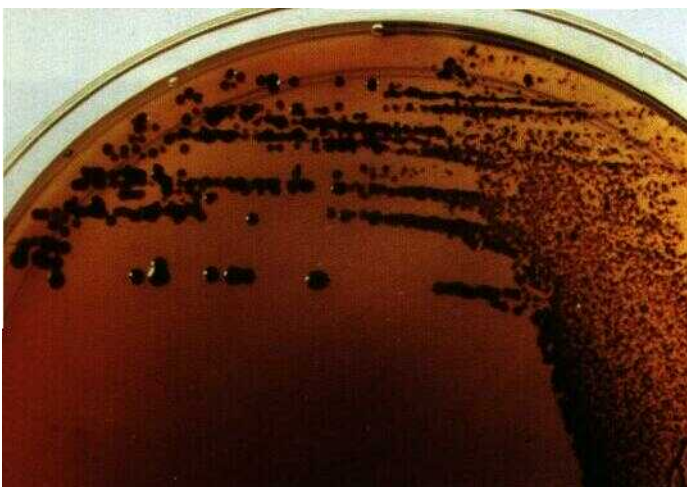




72



73



74

72. Coloration de Gram : *Fusobacterium nucleatum*.

73. Anaérodiscs : *Fusobacterium mortiferum*.

74. Colonies de *Bacteroides melaninogenicus*.

75. Anaérodiscs : *Bacteroides fragilis*.

76. Angine de Vincent. Coloration de Gram. Association fuso-spirochétienne.

77. Colonie de *Gardnerella vaginalis*.

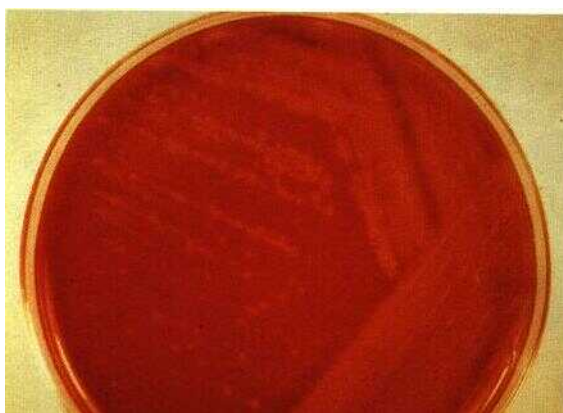


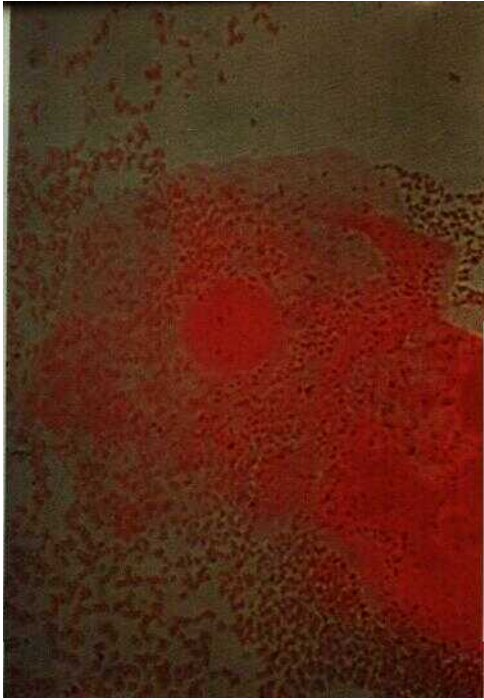
75

76



77





78

78. Clue-cell.



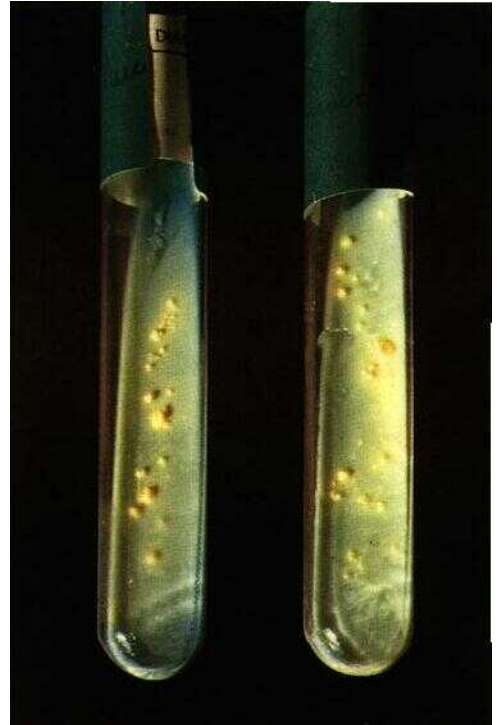
79

79. Coloration de Ziehl-Neelsen.
Bacilles acido-alcool-résistants: *M. tuberculosis*.

80. Milieu de Lowenstein-Jensen.
Colonies de *M. tuberculosis*.

81. Coloration de Ziehl-Neelsen.
M. avium.

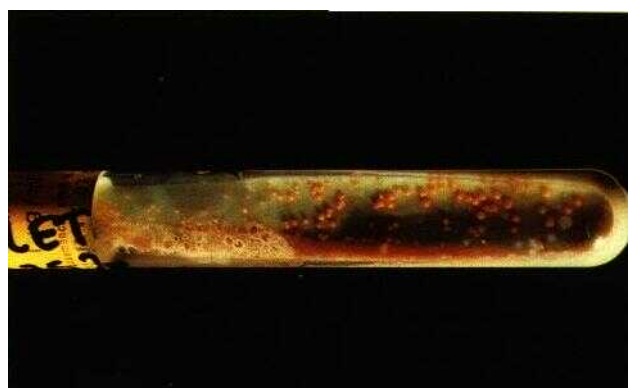
82. Milieu de Lowenstein-Jensen.
Colonies de *M. gordonae*.

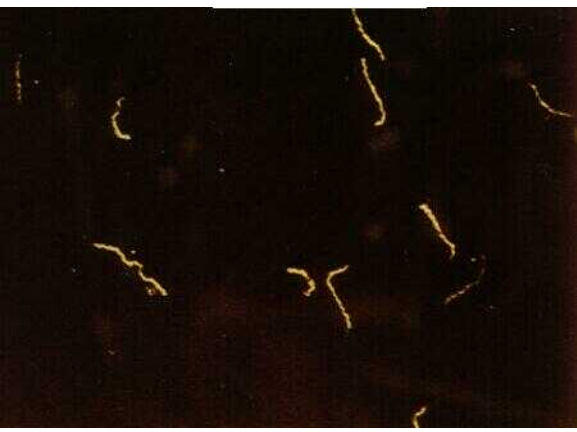


80

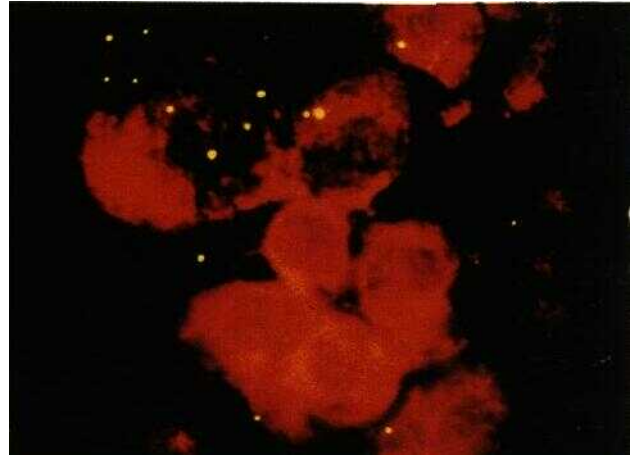
81

82





83



84



85

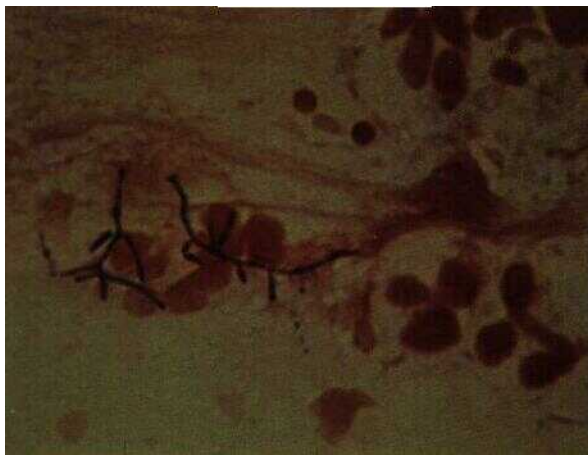
83. Immunofluorescence. *Treponema pallidum*.

54. *Chlamydia*. Immunofluorescence.

85. *Chlamydia*. Culture de cellules. Inclusions.

86. Coloration de Gram. *Nocardia* dans un pus.

87. Coloration de Gram. *Actinomyces* dans un pus.



86



87

Chapitre XXIV

CAMPYLOBACTER-HELICOBACTER

CAMPYLOBACTER

HISTORIQUE

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

En 1963, par l'étude du G + C % du DNA, Sébald et Véron ont montré que ces bactéries sont différentes des *Vibrio* (G + C % = 40 à 52) et forment un nouveau genre, *Campylobacter* (G + C % = 30 à 38).

Au cours des dernières décennies les conditions d'isolement des *Campylobacter* ont été améliorées et le rôle de ces bactéries comme agents d'entérites a été démontré.

1 - DÉFINITION



Les *Campylobacter* sont des bacilles à Gram négatif caractérisés par :

- leur morphologie. Bacilles fins, de 0,5 à 5 µm de long, incurvés en forme de virgule, en forme de S, de « vol de mouette » ou de forme hélicoïdale pour les formes longues.
- leur **mobilité**. Elle est très vive due à une ciliature polaire monotriche. Elle est classiquement décrite comme un « vol de moucheron ». Les formes longues peuvent être flagellées aux deux extrémités.

leur métabolisme respiratoire **micro-aérophile**.
une réaction **oxydase** (+).
un G + C % du DNA compris entre 30 et 38 %.

II - CLASSIFICATION

La catalase permet de diviser le genre *Campylobacter* en deux groupes.

A - Groupe catalase négatif

Les espèces qui forment ce groupe ne sont pas pathogènes pour l'homme.

C. sputorum est subdivisé en 3 sous-espèces :

- subsp. *sputorum*, trouvée dans la flore buccale normale.
- subsp. *bubulus*, trouvée dans les sécrétions préputiales du taureau.
- subsp. *mucosalis*, isolé d'adénomes intestinaux du porc.

B - Groupe catalase positif

Dans ce groupe on distingue :

- *C. fetus*, avec deux sous-espèces: *C. fetus* subsp. *fetus*, responsable de septicémies chez l'immuno-déprimé, il est aussi pathogène pour les bovins et les ovins ; *C. fetus* subsp. *venerealis* est responsable d'avortements et de stérilité du bétail.
- *C. jejuni* est aujourd'hui reconnu comme une bactérie fréquemment responsable de diarrhées chez l'homme.
- *C. coli* est proche de *C. jejuni* et a un pouvoir pathogène identique.

C - Autres espèces

D'autres espèces récemment reconnues sont rattachées au genre *Campylobacter* :

- *C. laridis* est fréquent chez les mouettes,
- *C. fecalis* est trouvé chez le bétail, mais pas chez l'homme,
- *C. hyointestinalis* donne des entérites chez le porc,
- *C. cinaedi* et *C. fennelliae* ont été trouvés dans le rectum d'homosexuels,
- *C. cryaerophila* et *C. nitrofigilis* n'ont été trouvés que dans l'environnement.
- *C. pylori* ou *C. pyloridis* souvent associé à des lésions de la muqueuse de l'estomac, est aujourd'hui classé dans le genre *Helicobacter*.

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Campylobacter* sont des bactéries trouvées dans le tube digestif des animaux, notamment les volailles, les ovins et les porcs. Les animaux de compagnie (chien et chat) ont été incriminés comme vecteurs de *Campylobacter*.

La contamination de l'homme se fait par voie digestive. Les cas de campylobactériose sont le plus souvent sporadiques. L'eau ou des laitages contaminés ont été à l'origine d'épidémies.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

En raison de leur grande mobilité les *Campylobacter* sont aptes à traverser le mucus. Ils peuvent pénétrer dans les entérocytes. Le caractère invasif de la bactérie se traduit par la présence de leucocytes et de sang dans les selles des malades.

Des toxines ont été mises en évidence chez des souches de *C. jejuni*. L'une d'elles a des propriétés voisines de la toxine cholérique. Une autre toxine aurait une activité cytotoxique. Leur rôle exact est encore à préciser.

V - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pour l'homme

- *C. fetus* subsp. *fetus*. Il est responsable de septicémies à point de départ digestif survenant chez la femme enceinte ou chez des sujets ayant une maladie sous-jacente : cirrhose, hémopathie, SIDA etc... Des infections localisées (cardiaques, méningées, articulaires) ont aussi été décrites.
- *C. jejuni* et *C. coll.* Ils sont beaucoup plus souvent rencontrés. Ils sont cause d'entérites qui sont plus fréquentes chez l'enfant vivant dans des conditions d'hygiène précaires. Après une incubation de 1 à 3 jours, survient une diarrhée fébrile avec parfois du sang dans les selles. Les douleurs abdominales et les vomissements sont habituels. La guérison survient spontanément en une semaine environ. Les bactériémies sont peu fréquentes. Quelques complications infectieuses (appendicites, cholécystites, péritonites) ou post-infectieuses (arthrites) ont été signalées.

B - Pour l'animal

- *C. fetus* subsp. *fetus* se rencontre comme commensal dans l'intestin des bovins, ovins, porcins et volailles. A partir de l'intestin la bactérie peut avoir une diffusion hématogène ; l'infection peut se localiser aux voies génitales et causer des « avortements sporadiques ».
- *C. fetus* subsp. *venerealis* ne se trouve que chez les bovins chez lesquels il provoque la « stérilité enzootique » d'origine vénérienne.

VI - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Les *Campylobacter* sont micro-aérophiles

Ils ont besoin pour leur croissance d'une atmosphère ayant une teneur réduite en oxygène, mais ils ont un métabolisme respiratoire et ne se développent pas en anaérobiose.

Le mélange gazeux le plus favorable à leur croissance contient : 5 % d'oxygène, 10 % de CO₂ et 85 % d'azote. Il est le plus aisément obtenu en utilisant un générateur adapté placé dans une jarre pour anaérobies.

B - Milieux de culture

Les *Campylobacter* se-développent sur gélose Columbia additionnée de 5 % de sang. Us se développent aussi sur Brucella Agar et sur milieu de Mueller-Hinton.

La croissance en milieu semi-gélose (0,15 % d'agar) comme le bouillon thioglycolate est meilleure qu'en milieu liquide.

Des **milieux sélectifs** pour rechercher les *Campylobacter* dans les selles ont été mis au point. Ils contiennent un mélange d'antibiotiques inhibant la plupart des bactéries de la coproflores :

- milieu de Butzier : bacitracine, novobiocine, cycloheximide, céfazoline, colistine.
- milieu de Skirrow : vancomycine, triméthoprim, polymyxine.
- milieu de Blaser : vancomycine, triméthoprim, polymyxine, céfalotine, amphotéricine.

Les *Campylobacter* se développent à 37°C, mais une température d'incubation de 42°C favorise la croissance de *C. jejuni*.

C - Aspect des colonies

Sur milieu gélose les colonies apparaissent en 2 à 4 jours. Elles mesurent 1 à 2 mm de diamètre. Elles sont plates, grisâtres et translucides. Elles peuvent avoir un bord irrégulier. Lorsque la gélose n'est pas parfaitement sèche, les colonies peuvent s'étaler. Elles ont parfois un aspect mucoïde.

Lorsque les colonies sont âgées, les corps bactériens deviennent coccoïdes. Cette forme de dégénérescence est irréversible.

D - Caractères biochimiques

- Tous les *Campylobacter* réduisent les nitrates en nitrites et sont oxydase (+).
- Les espèces ayant un intérêt médical possèdent toutes une catalase.
- Ils n'hydrolysent pas les sucres.
- *C. jejuni* se distingue par son aptitude à hydrolyser l'hippurate.

Les caractères qui permettent de distinguer les principales espèces de *Campylobacter* rencontrés en médecine humaine sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

Espèce	Croissance à		Sensibilité à		Hydrolyse de l'hippurate
	25°C	42°C	Ac. nalidixique	céfalodne	
<i>C. fetus</i>	+		R	S	-
<i>C. jejuni</i>		+	S	R	+
<i>C. coli</i>		+	S(1)	R	-

(1) *C. tanidis* se distingue par sa résistance à l'acide nalidixique.

VII - RECHERCHE DE *C. JEJUNI* DANS LES SELLES

- Elle doit être effectuée sur des selles fraîchement émises ou conservées à +4°C.
- L'examen direct au microscope à contraste de phase ou au fond noir d'une goutte de suspension fécale est un temps essentiel. Il permet souvent de reconnaître des bacilles ayant la mobilité caractéristique.
- L'examen microscopique des selles après coloration au bleu de méthylène peut montrer des polynucléaires en quantité importante qui sont le témoin du pouvoir invasif de la bactérie.
- La culture est généralement faite par ensemencement des milieux sélectifs décrits plus haut. Une autre possibilité est de filtrer une suspension de selles sur un filtre de 0,65 μ l qui est ensuite posé directement sur le milieu gélose et laissé en place une heure.

IX - TRAITEMENT ANTIBIOTIQUE

Les formes septicémiques ou autres que digestives de campylobactériose justifient un traitement antibiotique par voie générale.

Pour l'entérite à *Campylobacter* dont la guérison est spontanée, la nécessité d'un traitement antibiotique se discute. L'antibiotique de choix est alors **l'érythromycine** qui permet de raccourcir la durée du portage digestif.

Les *Campylobacter* sont sensibles aux aminosides, aux tétracyclines, au chloramphénicol et à la combinaison amoxicilline-acide clavulanique. La sensibilité à l'ampicilline est inconstante. Ils sont résistants à la colistine, au cotrimoxazole, à la rifampicine et à la céfalotine.

HELICOBACTER

HISTORIQUE

Il y a bientôt 100 ans que des bactéries en forme de spires, comme les spirochètes, ont été observées dans l'estomac de l'homme ou des animaux. Il y a environ 50 ans que l'on sait que la muqueuse gastrique possède une activité uréasique capable de transformer l'urée en ammoniac. Ces observations sont aujourd'hui expliquées par l'existence de *Helicobacter pylori*.

La découverte d'une bactérie incurvée qui constitue une nouvelle espèce bactérienne désignée comme *Campylobacter* puis *Helicobacter pylori* semble devoir modifier bien des aspects de la gastro-entérologie.

En 1979, Warren, un auteur australien, a observé sur des échantillons de muqueuse antrale des bactéries incurvées qui furent alors appelés *Campylobacter-like organisms*. Ces bactéries étaient présentes dans presque tous les échantillons reçus et dont la plupart avaient l'aspect histologique d'une gastrite chronique active.

Marshall et Warren constataient en 1982 que ces bactéries étaient généralement présentes chez les patients pour lesquels une indication de gastroscopie était posée et cette présence était indépendante de la nature de la maladie ou des symptômes en cause. Les mêmes auteurs ont ensuite fait un travail prospectif sur 100 malades soumis à une gastroscopie et une biopsie de la muqueuse. Une bactérie incurvée à Gram négatif micro-aérophile et catalase positive a été trouvée chez 95 % des malades ayant une gastrite chronique active. Les isolements ont été positifs chez 70 % des malades ayant un ulcère gastrique et 90 % des malades ayant un ulcère duodénal. Par contre, la bactérie n'a pas été isolée à partir d'échantillons de muqueuse saine.

1 - DEFINITION ET CLASSIFICATION

Les *Helicobacter* sont des bacilles à Gram négatif incurvés ou en forme de C, de U, ou de S, mobiles par la présence de 4 à 6 flagelles polaires. Les bacilles sont microaérophiles, de croissance difficile et oxydase (+).

Deux espèces sont décrites :

- *H. pylori*, isolé de la muqueuse gastrique des primates,
- *H. mustelae*, isolé de la muqueuse gastrique du furet, et dont il ne sera pas parlé ci-dessous.

II - HABITAT ET EPIDEMIOLOGIE

L'homme est le seul réservoir connu de *H. pylori*. Le mode de transmission n'est pas connu. *H. pylori* a été trouvé dans le monde entier. Il est isolé avec une particulière fréquence dans l'estomac des ulcéreux ou des sujets atteints d'une gastrite, même asymptomatique.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

H. pylori est mobile dans le mucus. Grâce à des adhésines il est capable d'adhérer aux cellules de la muqueuse de l'estomac où on le trouve dans les espaces intercellulaires.

L'uréase que possède *H. pylori* permet la production d'ions d'ammonium capables de neutraliser l'acidité gastrique, ce qui permet à la bactérie de se multiplier.

Une protéine cytotoxique produite par la bactérie empêcherait les cellules à mucus de produire un mucus protégeant la muqueuse de l'acidité.

IV - POUVOIR PATHOGENE

Plusieurs études montrent que *H. pylori* joue un rôle étiologique important dans la gastrite de type B (gastrite antrale chronique active) et dans la pathogénie de l'ulcère gastro-duodéal). L'éradication de *H. pylori* de la muqueuse est corrélée avec une diminution de la fréquence des rechutes de l'ulcère duodéal.

V - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE *H. PYLORI*

A - Prélèvement

Des biopsies gastriques sont effectuées au cours d'une gastroscopie. Les prélèvements pour l'examen bactériologique sont, soit placés dans du sérum physiologique à +4°C et ensemencés dans l'heure, soit placés dans un milieu de transport adapté.

La benzocaïne et le siméthicone ont sur *H. pylori* un effet inhibiteur que n'a pas la lidocaïne.

La bactérie n'est pas retrouvée dans le liquide gastrique.

B - Mise en évidence de l'activité uréasique

Elle peut être recherchée directement soit en salle de gastroscopie, soit au laboratoire à partir d'un fragment biopsique.

C - Examen microscopique

Un broyat d'un fragment biopsique est coloré par la méthode de Gram. Des bacilles à Gram négatif spirales ou incurvés dont la répartition sur le frottis est hétérogène sont trouvés.

Un anticorps monoclonal a aussi été utilisé pour la mise en évidence de *H. pylori* par immunofluorescence directe.

C - Mise en culture

Sur gélose chocolat au sang de cheval enrichie de 1 % d'Isovitalex, incubée à 37°C, en microaérophilie (10 % de CO₂) et atmosphère humide, de petites colonies (1 mm) transparentes, lisses et régulières se développent en 3 à 7 jours.

Le milieu peut être rendu sélectif par addition de vancomycine (6 mg/l) et de cefsulodine (5 mg/l).

L'identification est fondée sur la morphologie des bacilles au Gram :

l'uréase très active, les réactions d'oxydase et catalase positives. Une phosphatase alcaline et une γ GT peuvent aussi être mises en évidence. Les autres caractères sont négatifs.

VI - DIAGNOSTIC INDIRECT

Le test à l'uréase (ou breath test) consiste à faire ingérer au patient de l'urée marquée au ^{13}C et à détecter après 20 minutes dans l'air expiré le CO_2 marqué provenant de la dégradation de l'urée par l'uréase.

La mise en évidence d'anticorps sériques peut être faite par fixation du complément, immunoblot ou agglutination de particules de latex sensibilisées. Mais l'interprétation est délicate puisque près de 50 % des sujets de 50 ans possèdent des anticorps dirigés contre *H. pylori*.

VII - TRAITEMENT

Les indications du traitement sont encore mal précisées.

H. pylori est sensible aux bêta-lactamines et aux aminosides. Il est résistant au triméthoprim-sulfaméthoxazole. Le sous-citrate de bismuth a une action lytique sur *H. pylori* mais est incapable à lui seul d'éradiquer la bactérie.

Le traitement préconisé associe ampicilline, métronidazole et sous-citrate de bismuth. Son efficacité doit être contrôlée par vérification de l'éradication de la bactérie un mois après arrêt de ce traitement.

BIBLIOGRAPHIE

FAUCHERE J.L., ROSENEAU A., *Campylobacter* et *Helicobacter* en pathologie digestive humaine. Médecine/Sciences, 1991,7,138-152.

Campylobacter

MEGRAUD F., LATRILLE J., « *Campylobacter jejuni* en pathologie humaine »,

I - Aspects cliniques et thérapeutiques. *Path. Biol.*, 1981, **29**, 245-253.

II - Diagnostic biologique et épidémiologie, *Path. Biol.*, 1981,**29**, 305-314.

PENNER J.L., « Thé genus *Campylobacter* : a decade of progress », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 157-172.

WALKER R.L., CALDWELL M.B., LEE E.C., *et al.*, « Physiopathology of *Campylobacter enteritis* », *Microbiol. Rev.*, 1986, **50**, 81-94.

Helicobacter

BLASER M.J., « *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation », *J. Infect. Dis.*, 1990, **161**, 626-633.

GOODWIN C.S., ARMSTRONG J.A., « Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* ». *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1990, **9**, 1-13.

MARSHALL B.J., « *Campylobacter pyloridis* and gastritis », *J. Infect. Dis.*, 1986,**153**, 650-657.

MEGRAUD F., BONNET F., GARNIER M., LAMOULIATTE H., « Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile and protein content », *J. Clin. Microbiol.*, 1985, **22**, 1007-1010.

Chapitre XXV

BRUCELLA

HISTORIQUE

C'est D. Bruce, médecin britannique, qui a isolé à Malte en 1887 la bactérie responsable de la « fièvre méditerranéenne » encore appelée fièvre de Malte, fièvre ondulante, ou mélitococcie. Le rôle de la chèvre dans sa transmission fut rapidement établi.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Les bactéries du genre *Brucella* sont des petits coccobacilles (0,5 à 1,5 µm de long) à Gram négatif, immobiles, ne formant pas de spore, cultivant mal sur milieux ordinaires. Aérobies stricts, leur croissance est souvent améliorée par le CO₂. Bactéries à multiplication intra-cellulaire facultative, elles peuvent infecter les animaux ou l'homme en provoquant une maladie, la brucellose, d'abord aiguë, puis chronique.

II - CLASSIFICATION

Le genre *Brucella* comprend 6 espèces.

- Trois espèces principales peuvent infecter l'homme.

Ce sont :

- *B. melitensis* : trouvée chez la chèvre et le mouton ;

- *B. abortus* : agent de l'avortement des bovins ;

- *B. suis* : trouvée chez le porc et le lièvre.

- Trois autres espèces, beaucoup plus rares, sont : *B. ovis*, *B. canis* et *B. neotomae*.

III - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Brucella* sont responsables d'une **anthropozoonose** qui touche le monde rural et est répandue dans le monde entier. La brucellose est particulièrement fréquente sur le pourtour du **bassin méditerranéen**.

A - Le réservoir de germes

Il est constitué par les **animaux d'élevage** : classiquement caprins et ovins pour *B. melitensis*, bovins pour *B. abortus* et porcins pour *B. suis*. En fait, ce ne sont que des hôtes de prédilection car la spécificité d'espèce n'est pas rigoureuse.

La maladie animale est souvent inapparente. Chez la femelle gravide, elle se manifeste par des avortements. La présence d'érythritol dans les tissus fœtaux et placentaires des animaux stimule la multiplication des *Brucella* et explique ce viscérotropisme. Les sécrétions vaginales des animaux malades disséminent la bactérie dans leur environnement (litières, fumier). L'atteinte de la glande mammaire entraîne l'excrétion de *Brucella* dans le lait.

Un meilleur contrôle de la brucellose animale entraîne une diminution du nombre de cas chez l'homme.

B - La contamination humaine

Brucella melitensis reste dominante dans la brucellose humaine en France, mais la proportion de *B. abortus* augmente sensiblement.

1. Elle est directe dans la majorité des cas (70 %)

L'homme se contamine par voie cutanée. Les *Brucella* pénètrent dans l'organisme à la faveur d'une excoriation cutanée même minime. Elles peuvent même traverser la peau saine. Une contamination conjonctivale est possible.

La brucellose est une **maladie professionnelle** qui atteint surtout les ruraux (vétérinaires, bergers, marchands de bestiaux etc...). La fréquence des contaminations des personnels de laboratoire est à souligner. Chez ces derniers la contamination par aérosols a été décrite. Deux malades sur trois sont des hommes en âge de travailler.

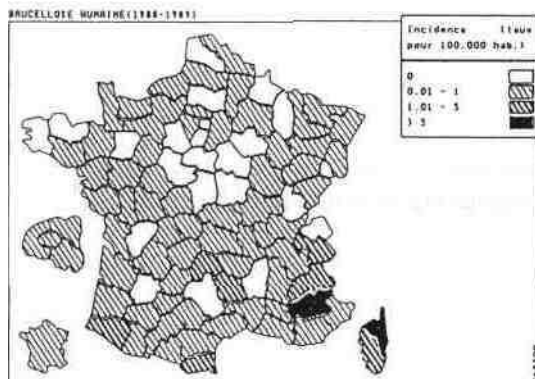
2. La contamination indirecte, digestive est plus rare

Elle est à l'origine de la maladie chez des vacanciers ou des citadins. Elle se fait par ingestion de lait cru (de chèvre ou de brebis) ou par consommation de fromage frais de fabrication artisanale.

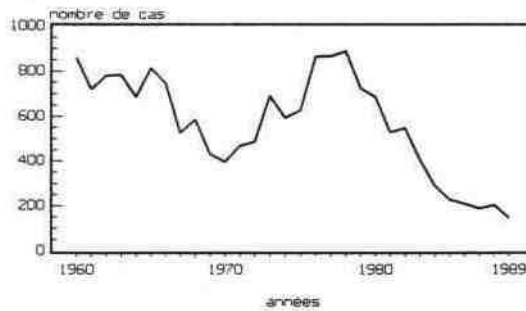
Il n'existe pas de contamination interhumaine.

Le nombre de cas déclarés par an est en diminution depuis 1978. En 1989, 164 cas de brucellose ont été déclarés aux autorités sanitaires.

Taux annuel moyen d'incidence des cas de brucellose humaine déclarés (1988 - 1989)



Évolution du nombre d« cas de brucellose humaine déclarés entre 1960 et 1989.



source : Bulletin
Épidémiologique
Hebdomadaire
n° 36/1990

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

La brucellose est une septicémie d'origine lymphatique. A partir de la porte d'entrée cutanée ou digestive, les *Brucella* gagnent par voie lymphatique le premier relais ganglionnaire et s'y multiplient.

Puis elles essaient par voie lymphatique ou sanguine pour coloniser les organes ayant une *trame réticulo-endothéliale* importante (ganglions, moelle osseuse, foie, rate). La répétition des décharges bactériennes se traduit par une fièvre ondulante.

Des localisations ostéo-articulaires, glandulaires, hépato-spléniques ou neuro-méningées peuvent survenir et continuer à évoluer pendant la phase subaiguë.

Les *Brucella* intra-cellulaires persistent des années dans l'organisme, ce qui entraîne une réaction immune de type hypersensibilité retardée.

V - POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME

Après une incubation de 2 à 4 semaines, la **brucellose aiguë septicémique** est caractérisée par la fièvre ondulante sudoro-algique. Bien supportée, cette fièvre peut passer inaperçue.

Les formes focalisées (ostéoarticulaires, neuro-méningées etc...) peuvent apparaître au décours des formes septicémiques ou être d'emblée isolées.

Les formes mineures inapparentes, caractérisées par l'absence de localisation, aboutissant à la *brucellose chronique* invalidante ou « patraquerie » sont fréquentes. En milieu rural, il faut considérer comme brucellose possible tout syndrome fébrile inexpliqué.

VI - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION D'UNE BRUCELLA

Il est indispensable que le clinicien précise au laboratoire qu'il demande une recherche de *Brucella* pour que les conditions de culture appropriées soient mises en oeuvre.

A - L'hémoculture

Au cours de la brucellose, elle est :
constamment positive pendant la phase aiguë,
fréquemment positive pendant la phase subaiguë,
exceptionnellement positive pendant la phase chronique.

Il est recommandé d'ensemencer le sang dans des **flacons de Castaneda**, flacon diphasique (contenant un milieu gélose et un bouillon) avec une atmosphère de 10 % de CO₂.

Les flacons sont conservés classiquement 6 semaines à 37°C car les colonies de *Brucella* sont parfois très lentes à se développer en primo-culture. Néanmoins, la croissance de la bactérie s'effectue le plus souvent en quelques jours. "

B - Autres produits pathologiques

La recherche de *Brucella* peut aussi se faire à partir de ganglions lymphatiques, moelle osseuse, liquide de ponction articulaire, liquide céphalo-rachidien, pus divers.

Les liquides sont ensemencés comme le sang, en flacon de Castaneda.

Les tissus sont broyés et ensemencés sur des milieux solides adéquats (*Brucella* agar, gélose Albimi, gélose Trypticase Soja) incubés à 37°C en atmosphère de 10 % de CO₂.

C - Caractérisation du genre *Brucella*

1. La lenteur de croissance à l'isolement est caractéristique

Il faut toujours plus de 48 heures et même parfois plusieurs semaines pour obtenir des colonies à partir d'un produit pathologique. Les colonies sont petites (0,5 mm de diamètre), lisses, translucides, à bords réguliers. Elles ont parfois une couleur de miel et sont constituées de petits **coccobacilles** à Gram négatif.

2. Les caractères suivants sont positifs

- aérobiose stricte
- catalase
- oxydase
- nitrate-réductase
- uréase (immédiate pour *B. suis*, négative pour *B. ovis*)

3. Les autres caractères métaboliques sont négatifs

D - Caractérisation de l'espèce (voir tableau I)

- Exigence en CO₂.
En France, 96 % des souches de *B. abortus* exigent une atmosphère de 10 % de CO₂ pour leur croissance. *B. melitensis* et *B. suis* ne sont jamais exigeantes. C'est un bon critère d'orientation.
- Production d'H₂ S.
B. melitensis n'en produit pas alors que les souches de *B. abortus* et *B. suis* en produisent en 24 heures (méthode du papier au sous-acétate de plomb).
- Action bactériostatique des colorants.
La fuchsine basique et la thionine à certaines concentrations ont une action bactériostatique. La thionine inhibe *B. abortus* et la fuchsine inhibe *B. suis*.
Les caractères ci-dessus permettent de différencier les principales espèces de *Brucella*. Néanmoins il existe des souches atypiques qui ne correspondent pas à ce schéma d'identification. Le recours à un laboratoire spécialisé est alors nécessaire.

TABLEAU 1
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES ESPÈCES PRINCIPALES VE BRUCELLA.

Espèce	Exig. en 002	Production de H ₂ S	Croissance en présence de		Agglutination avec sérums monospécifiques (1)	
			Thionine	Fuchsine basique	A	M
<i>B. melitensis</i>			+	+		+
<i>B. abortus</i>	+	+		+	+	
<i>B. suis</i>		++	+		+	

(1) : A = anti-*abortus* ; M = anti-*melitensis*.

E - Détermination du biotype

Faite en laboratoire spécialisé, elle fait appel à 3 types de techniques

1. Agglutination

par des sérums monospécifiques, *anti-Abortus* (A), *anti-Melitensis* (M).

Antigènes de surface des *Brucella* :

- Bactéries en phase S (smooth)

Toutes les espèces suivantes possèdent deux antigènes de surface A et M qui sont agglutinogènes : *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* et *B. neotomae*. La quantité de ces antigènes diffère selon les espèces : M est prédominant chez *B. melitensis*, A est prédominant chez les 3 autres espèces.

Un sérum *anti-brucella* global agglutine les 4 espèces. Par saturation, il est possible d'obtenir des sérums monospécifiques anti A ou anti M.

- Bactéries en phase R (rough)

Les spécificités A et M sont remplacés **par un** antigène R commun à toutes les *Brucella*, y compris *B. ovis* et *B. canis* qui n'ont ni A ni M.

2. Lysotypie

par les phages Tbilissi (Tb) et Weybridge (We).

3. Étude du métabolisme oxydatif des sucres

Elle se fait par une méthode manométrique.

On reconnaît 3 biotypes pour *B. melitensis*, 9 biotypes pour *B. abortus* et 4 biotypes pour *B. suis*.

VII - DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

Les symptômes de la brucellose sont peu caractéristiques, aussi le diagnostic de la maladie n'est souvent évoqué qu'à un stade où les hémocultures sont négatives. Dans cette situation, les méthodes immunologiques ont toute leur importance, car elles permettent un diagnostic indirect.

A - Réactions sérologiques

Elles peuvent donner des résultats discordants car elles ne décèlent pas toujours les mêmes classes d'anticorps. Aussi il peut y avoir intérêt à pratiquer simultanément deux ou trois de ces réactions.

1. Sérodiagnostic de Wright ou réaction d'agglutination lente

a/ Principe

C'est la plus classique des réactions sérologiques de brucellose. Elle consiste à rechercher l'agglutination des *Brucella* (souche de *B. abortus*) en présence de dilutions du sérum à étudier. Cette réaction met en évidence les IgM et les IgG. Elle est la plus précocement positive au cours de la maladie (environ 10 à 15 jours après le début).

C'est une bonne méthode de diagnostic de la brucellose aiguë, mais elle se négative rapidement. Elle est parfois négative dans les brucelloses subaiguës et presque toujours négative dans les brucelloses chroniques.

b1 Interprétation

Une agglutination à 1/80 est positive. Mais une agglutination à un titre inférieur doit être considérée comme suspecte d'une brucellose au début ou au déclin, et faire pratiquer un nouvel examen une ou deux semaines plus tard.

EXPRESSION DU SERODIAGNOSTIC DE WRIGHT en Unités Internationales

Pour pouvoir comparer valablement les résultats obtenus dans diverses régions, la nécessité s'est imposée de préparer des antigènes brucelliques d'agglutinabilité identique et donc de disposer d'un sérum agglutinant étalon.

Pour exprimer le sérodiagnostic de Wright en Unités Internationales, il faut disposer d'un étalon à 1 000 Unités, que l'on manipule en parallèle avec les sérums à étudier. On note, d'une part, le titre obtenu avec l'étalon et, d'autre part, avec un sérum, et l'on pratique une règle de trois :

Titre en UI =
1 000 x inverse du titre du sérum à étudier

Inverse du titre du sérum étalon obtenu

Exemple :

Titres obtenus : sérum étalon 1/1280
 sérum étudié..... 1/640

Titre en UI du sérum étudié :
1 000 x 640
----- = 500 Unités
1 280

En notation unitaire, on considère que le sérodiagnostic est positif pour un titre \geq 100 UI.

c1 Causes d'erreurs

- Faux positifs

De fausses agglutinations peuvent être dues à la parenté antigénique entre les *Brucella* et d'autres bactéries ; *Yersinia enterocolitica* sérotype 09, *Vibrio cholerae* (vaccination), *Francisella tularensis* et rarement *Escherichia coli* 0 157.

Chez les anciens mélitococciques, le taux d'agglutination peut s'élever d'une façon transitoire à la suite d'une infection banale ou d'une vaccination hétérologue.

L'injection de mélitine ne semble pas modifier le taux des agglutinines antibrucelliques dans le sérum d'un patient. Cependant, il est prudent d'effectuer le prélèvement pour sérodiagnostic avant l'intradermoréaction.

- Faux négatifs

Recherche d'anticorps bloquants. Des **anticorps bloquants** ou **incomplets** apparaissent dans le sérum de quelques malades, surtout à la phase de brucellose chronique. Ce sont des IgA ou des IgG qui bloquent les sites antigéniques à la surface des bactéries utilisées pour le sérodiagnostic de Wright, sans provoquer d'agglutination. Le sérodiagnostic de Wright apparaît comme négatif chez ces malades.

Un sérodiagnostic de Wright négatif doit faire rechercher les anticorps bloquants soit par la méthode indirecte de Coombs, soit par un « blocking-test ». Ce procédé consiste à ajouter dans les tubes du sérodiagnostic de Wright restés négatifs, une goutte de sérum positif. S'il ne s'y produit pas d'agglutination c'est qu'elle est inhibée par les anticorps bloquants fixés sur les *Brucella*.

2. Épreuve à l'antigène tamponné (E.A.T.) ou réaction à l'antigène au Rosé de Bengale ou Card-Test.

C'est une réaction rapide d'agglutination sur lame. Elle utilise une suspension en milieu acide tamponné de *Brucella* inactivées et colorées par le rosé bengale.

Ne mettant en évidence que les IgG, cette réaction est positive un peu plus tardivement que le sérodiagnostic de Wright, mais elle est très sensible et reste plus longtemps positive. Sa bonne spécificité et sa simplicité en font une réaction très utile pour les enquêtes épidémiologiques.

TABLEAU n
MÉTHODE DE DIAGNOSTIC DE LA BRUCELLOSE
EN FONCTION DU STADE DE LA MALADIE

Stade de la brucellose	Hémo-cultures	Wright	E.A.T. ou Rosé Bengale	Fixation du complément	Immuno-fluorescence	Intradermo-réaction
Aiguë	+++	+	±	±	±	-
Subaiguë ou focalisée	+	+++	+++	+++	+++	+
Chronique		±	±	±	+	+++

3. Réaction de fixation du complément

De mise en œuvre délicate, la réaction de fixation du complément met en évidence les IgG. Elle est donc, elle aussi, plus tardivement positive et reste plus longtemps positive.

Pour les sérums négatifs en agglutination et présentant des taux égaux ou supérieurs à 1/10 en fixation du complément, la brucellose semble devoir être incriminée. Cependant cette réaction peut être faussement positive dans les mêmes circonstances que le sérodiagnostic de Wright.

4. Immunofluorescence indirecte

Cette réaction se positive un peu plus tardivement que la séro-agglutination de Wright. Elle est très utile dans les brucelloses chroniques, car elle décèle encore la présence d'anticorps alors que les autres réactions sont devenues négatives.

La relative complexité de la manipulation lui font préférer pour les enquêtes épidémiologiques l'épreuve à l'antigène tamponné, beaucoup plus simple.

5. Contre-immunoelectrophorèse

Contrairement aux techniques ci-dessus qui utilisent des antigènes lipopolysaccharidiques, cette technique utilise un antigène protéique extractible de *Brucella* qui est très spécifique.

B - Intradermoréaction

La mise en évidence de l'allergie brucellienne par intradermoréaction peut être le seul signe biologique d'une brucellose chronique.

1. La mélitine de Burnet

La mélitine de Bumet est un filtrat de culture en bouillon de *Brucella melitensis*. L'injection intradermique (0,1 ml) se fait à la face antérieure de l'avant-bras. Pour éviter la cause d'erreur due à une hypersensibilité aux protéines du bouillon qui a servi à la préparation de la mélitine, on pratique à l'autre avant-bras une injection témoin de bouillon, qui doit rester négative.

La lecture se fait de 24 à 48 heures après l'injection. Une réaction positive se caractérise par une zone érythémateuse et un œdème local pouvant s'apprécier au toucher. Il ne faut pas tenir compte d'une réaction précoce et fugace.

L'apparition d'une allergie à la mélitine est plus tardive que celle des agglutinines sanguines. Une intradermoréaction à la mélitine positive persiste très longtemps après la guérison de la maladie, et souvent toute la vie. Elle ne signifie pas obligatoirement une maladie active.

2. La fraction phénol-soluble

Cette fraction est extraite d'une souche délipidée de *B. abortus*. Elle est utilisée comme antigène par voie intradermique pour dépister l'état allergique d'un sujet vis à vis de la brucellose. Utilisable pour le diagnostic de la maladie, ce test intradermique est préconisé pour les sujets exposés candidats à la vaccination.

VIII - TRAITEMENT

A - Formes aiguës et formes focalisées

Les cyclines sont très actives à cause de leur bonne pénétration dans les cellules. Les souches de *Brucella* résistantes sont rares.

Les autres antibiotiques actifs sont : streptomycine, rifampicine, chloramphénicol et sulfamides. Le traitement usuel, dont la durée est de six semaines, associe la doxycycline à la rifampicine. Il a prouvé une meilleure efficacité que l'ancienne association tétracycline et streptomycine.

B - Formes chroniques

L'antigénothérapie est la seule efficace dans ces formes. Une désensibilisation à doses progressives est faite en utilisant :

- soit une suspension de *B. melitensis* tuées par chauffage, injectée par voie sous-cutanée ;
- soit la fraction antigénique phénol-insoluble injectée par voie intra-dermique.

IX - PRÉVENTION

L'incidence de la brucellose humaine est fonction de l'importance de la maladie dans le cheptel et de la prophylaxie de la maladie animale. Les mesures préventives sont :

dépistage des animaux contaminés (par examen sérologique et contrôle des produits laitiers) ; abattage des animaux malades ; vaccination des femelles jeunes.

chez l'homme, la vaccination des professionnels exposés est à conseiller. Les vaccins tués ou vivants sont aujourd'hui remplacés par l'emploi de fractions antigéniques mieux tolérées et provoquant une bonne immunité. L'extrait antigénique, appelé fraction PI (phénol-insoluble), extrait de la paroi de *B. melitensis* et constitué de glycoprotéines, confère une immunité de 18 mois environ. La vaccination ne doit être effectuée qu'après l'exclusion d'une atteinte brucellose par dépistage de l'état allergique du sujet vis-à-vis de la brucellose.

BIBLIOGRAPHIE

BERTRAND A., SERRE A., JANBON F., VENDRELL J. P., « Aspects immunologiques de la brucellose : étude évolutive et valeur pratique de diverses explorations biologiques », *Méd. Mal. Inf.*, 1982, 12, 582-587.

LAUDAT P., AUDURIER A., CHOUTET P. *et al.*, « Sérologie de la brucellose : évaluation comparative des réactions d'agglutination, de fixation du complément, d'immunofluorescence indirecte et de la contre-immunoelectrophorèse », *Med. Mal. Infect.*, 1987,17, 58-61.

STASKIEWICZ J., LEWIS C.M., COLVILLE J., ZERVOS M., BAND J., Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 287-290.

YOUNG E. J., « Human brucellosis », *Rev. Infect. Dis.*, 1983,5. 821-842.

Chapitre XXVI LEGIONELLA

HISTORIQUE

L'histoire de la découverte de ce nouveau genre bactérien constitue un modèle de recherche épidémiologique et bactériologique par la remarquable organisation de l'enquête réalisée sur le terrain et les moyens déployés.

Du 21 au 24 juillet 1976 a eu lieu à l'Hôtel Bellevue-Stratford de Philadelphie, le 58^e congrès de l'**American Legion** (anciens combattants).

Parmi les 4400 participants, 182 personnes (légionnaires et accompagnants) furent atteintes de pneumopathie, 15,9 % en moururent. Seize autres personnes présentèrent des formes asymptomatiques découvertes *a posteriori*. Des cas identiques (appelés « pneumonies de la grand-rue ») furent observés chez des personnes qui n'étaient pas entrées dans l'hôtel, mais s'étaient trouvées dans la rue proche durant le même mois de juillet ; de même, d'autres cas furent observés chez des participants à d'autres réunions dans le même hôtel. La notion d'épidémie n'apparut pas tout de suite car la plupart des cas ne se déclarèrent qu'après la fin du congrès et ce n'est que trois jours plus tard que les praticiens de la ville alertèrent les services sanitaires, déclenchant ainsi une vaste enquête épidémiologique.

Il apparut alors que la contamination s'était faite par voie aérienne dans le hall de l'hôtel ou sur le trottoir. L'agent causal, infectieux ou non, fut alors activement recherché. On chercha ainsi longtemps un métal ou un autre agent toxique dans les tissus des sujets décédés ; d'autre part, on employa 14 types de milieux bactériologiques ou mycologiques et 13 types de cultures cellulaires afin de mettre en évidence un éventuel agent infectieux.

Finalement, le 18 janvier 1977, Mac Dade et coll. annoncèrent qu'une bactérie à Gram négatif avait été isolée de fragments pulmonaires provenant de 4 des sujets décédés. Ces broyais de poumon furent inoculés, par voie péritonéale, à des cobayes qui présentèrent en quelques jours une maladie fébrile mortelle. Les examens de frottis de foie et de rate montrèrent de nombreux bacilles et l'inoculation d'un broyât de ces organes dans la membrane vitelline d'oeufs embryonnés entraîna leur mort en 4 à 6 jours. Le rôle étiologique de cette bactérie dans l'épidémie de Philadelphie fut démontré par immunofluorescence indirecte sur des sérums de convalescents de la maladie.

Ultérieurement, des enquêtes sérologiques rétrospectives permirent de rattacher à cette maladie plusieurs épidémies de pneumopathies aiguës inexplicables.

En 1974 à Philadelphie, vingt personnes participaient à un congrès à l'Hôtel Bellevue-Stratford, onze développaient une pneumopathie sévère, deux en décédaient.

En 1973 à Benidorm en Espagne, huit touristes écossais contractaient des infections pulmonaires, trois en mouraient. Ils avaient tous séjourné dans le même hôtel en juillet.

En 1965 à Washington D.C., on recensait à l'hôpital psychiatrique Sainte-Elisabeth 81 malades atteints de pneumonie grave dont 14 décédaient. L'infection avait touché les sujets dormant la fenêtre ouverte sur le parc et ceux se promenant dans ce même parc où des travaux de terrassement étaient effectués.

En 1968 à Pontiac, Michigan, on recensait 144 cas de maladies fébriles aiguës bénignes chez les employés et les clients d'un centre de santé. L'infection était synchronisée avec la mise en marche du système de climatisation.

En 1943, Tatiocock avait isolé une souche de *L. micdadei* sous l'appellation « Rickettsia-like ».

On constata donc qu'il ne s'agissait pas d'une maladie nouvelle. Finalement, en 1980, cette bactérie fut dénommée *Legionella pneumophila*.

TAXONOMIE - CLASSIFICATION

Les *Legionella* appartiennent à une nouvelle famille bactérienne : celle des *Legionellaceae*.

La classification généralement admise est celle de Brenner : la famille des *Legionellaceae* ne comporte actuellement qu'un seul genre : *Legionella*, avec près d'une trentaine d'espèces identifiées par hybridation ADN/ADN et étude en chromatographie de partage gaz-liquide (tableau I). L'espèce type est *L. pneumophila* qui est la plus fréquente en pathologie médicale et qui comporte 14 sérogroupes.

Certains auteurs mentionnent de nettes différences parmi les espèces du genre *Legionella* et parlent de bactéries voisines dénommées *Fluoribacter* (*F. bozemanii*, *F. dumoffii*, *F. gormanii*) *Tatiodkia* (*L. micdadei*, *L. maceachernii*).

TABLEAU I
PRINCIPALES ESPÈCES DE *LEGIONELLA* ACTUELLEMENT RENCONTRÉES
EN PATHOLOGIE MÉDICALE OU DANS L'ENVIRONNEMENT

ESPÈCES	SOURCES D'ISOLEMENT
<i>L. pneumophila</i> (14 sérogroupes)	tissu pulmonaire, circuit de refroidissement
<i>L. anisa</i>	pleurésie, eau chaude
<i>L. birminghamensis</i>	pneumonie
<i>L. bozemanii</i> (2 sérogroupes)	tissu pulmonaire
<i>L. cincinnatiensis</i>	pneumonie
<i>L. dumoffii</i>	pneumonie
<i>L. feeleii</i> (2 sérogroupes)	pneumonie
<i>L. hackeliae</i> (2 sérogroupes)	pneumonie
<i>L. jordanis</i>	biopsie pulmonaire, eau de rivière
<i>L. longbeachae</i> (2 sérogroupes)	aspiration transtrachéale, pneumonie
<i>L. maceachernii</i>	pneumonie, citerne d'eau potable
<i>L. micdadei</i>	sang, pneumonie
<i>L. oakridgensis</i>	pneumonie
<i>L. tucsonensis</i>	pneumonie
<i>L. wadsworthii</i>	pneumonie
<i>L. cherii</i>	citerne d'eau potable
<i>L. erythra</i>	circuits de refroidissement
<i>L. fairfieldensis</i>	circuit de refroidissement
<i>L. gormanii</i>	terre
<i>L. jamestowniensis</i>	terre humide
<i>L. parisiensis</i>	circuit de refroidissement
<i>L. rubrilucens</i>	eau du robinet
<i>L. sainthelensi</i>	fontaine
<i>L. spiritensis</i>	étang

II - ÉCOLOGIE

A - Habitat

Les *Legionella* sont des **bactéries aquatiques** banales de notre environnement naturel. On les trouve dans l'eau (chaude de préférence) où leur survie est longue : lacs, rivières, marais, terres humides, conduites d'eau ; dans l'air : vapeur d'eau, aérosols, nébulisateurs.

L'étude des cas de légionellose a montré que la présence du germe est liée à la proximité de travaux de terrassement, de réservoirs hydriques, d'aérosols engendrés soit par les tours de réfrigération des systèmes de **climatisation**, soit par les pommeaux de douches, les robinets grand ouverts...

Ces bactéries aux conditions de culture pourtant exigeantes peuvent s'y développer, atteignant des concentrations de l'ordre de 10^6 bactéries par litre. Il semble que la présence d'une flore microscopique associée (*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, protozoaires...) facilite la croissance des *Legionella*. On insiste notamment sur le rôle des amibes libres (genres *Acanthamoeba* et *Naegleria*) qui, en ingérant sans les détruire les *Legionella*, semblent leur fournir de parfaites conditions de survie et de dissémination.

Ces bactéries sont tuées par une chaleur supérieure à 65°C et la chloration de l'eau.

B - Épidémiologie

Il a été montré que les *Legionella* (essentiellement *L. pneumophila* séro groupe 4) étaient présentes dans 60 % des prélèvements d'eaux effectués en ville.

Par ailleurs la prévalence des *Legionella* dans les pneumonies est modeste (environ 4 %), il semble donc que la notion de terrain soit très importante.

La présence de *Legionella* dans un prélèvement d'eau ne doit donc pas inquiéter, hormis dans un service d'immunodéprimés (greffés, hémopathies) où la stérilisation de l'eau devra être envisagée.

D faut noter qu'il n'y a **pas de transmission d'un individu à l'autre** et que le portage sain est exceptionnel.

Pour surveiller les contaminations humaines, la légionellose est aujourd'hui une maladie à **déclaration obligatoire** (voir annexe).

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pouvoir pathogène naturel

Les infections humaines sont généralement dues à *L. pneumophila* (90 % des cas), les autres espèces étant plus rarement en cause et leur pathogénicité encore mal connue.

Les légionelloses surviennent en général sur un **terrain particulier**. Elles touchent plus souvent l'homme de plus de 50 ans, le fumeur, l'éthylique, les personnes porteuses d'une affection cardiopulmonaire chronique, d'une insuffisance rénale chronique ou d'un diabète, les sujets en état d'immunodépression cellulaire.

1. *Forme clinique habituelle : la maladie des légionnaires*

L'incubation dure 2 à 10 jours. Après un début progressif, le malade présente la phase d'état : **un syndrome infectieux intense** et une atteinte respiratoire (pneumonie extensive mal systématisée), souvent associée à un épanchement pleural.

Dans 1/4 des cas, il existe des **troubles neurologiques** sans signes de focalisation (céphalées, confusion mentale, crises convulsives). La ponction lombaire est le plus souvent normale. Il existe rarement une méningite, une encéphalite, une polyradiculonévrite. Le mécanisme le plus souvent avancé est celui d'une toxine neurotrophe.

Les **troubles digestifs** sont fréquents (diarrhées notamment).

Dans le tableau biologique, il existe souvent des signes biologiques d'atteintes hépatique et rénale ; on note aussi une hyponatrémie et une hypophosphorémie.

Le diagnostic de légionellose est donc à évoquer devant une pneumopathie très fébrile extensive associée à des manifestations extra-pulmonaires (diarrhée) survenant sur un terrain privilégié, pour laquelle les examens bactériologiques usuels sont négatifs.

2. Autres formes cliniques

al Légionellose des immunodéprimés (légionelloses nosocomiales)

Les sujets transplantés, les malades ayant une leucémie à tricho-leucocytes, ou un cancer bronchique constituent des groupes à très haut risque. Pour les sujets atteints de SIDA, cancers génitaux ou du sein, ce risque semble plus faible.

L'étiologie généralement plurimicrobienne et un terrain fragile font que l'évolution est souvent très grave avec un taux de létalité très élevé (environ 40 %).

bl La fièvre de Pontiac

C'est une atteinte bénigne des voies aériennes supérieures, causée par une souche particulière de *L. pneumophila* séro-groupe 1.

L'incubation est courte (36 heures), les clichés pulmonaires sont normaux, la guérison est spontanée en quelques jours.

cl Les formes inapparentes sont fréquentes

Les études sérologiques montrent que plus de 10 % de la population a un taux élevé d'anticorps *aaû-pneumophila* séro-groupe 1.

dl Autres formes

hématologiques, rénales, cérébrales, cutanées, cardiaques (valve artificielle) ou musculaires.

B - Pouvoir pathogène expérimental

Le cobaye inoculé par voie intra-péritonéale développe une maladie fébrile évoluant vers la mort en quelques jours.

On observe pendant les 4 premiers jours une péritonite, puis le germe passe dans les vaisseaux sanguins et les lymphatiques. Des foyers de nécrose apparaissent ensuite au niveau de la rate, du foie, des poumons où l'on retrouve ces germes en grand nombre.

Les bacilles sont phagocytés par les monocytes-macrophages, cellules dans lesquelles les *Legionella* peuvent survivre. La lyse de ces cellules immunitaires est à l'origine de la dissémination microbienne.

Une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR) a été mise en évidence chez des cobayes sensibilisés après inoculation de bactéries vivantes ou tuées par la chaleur. Cette HSR est détectée par l'antigène protéique commun aux divers sérogroupes de *L. pneumophila*.

Cette bactérie possède une endotoxine dont l'activité *in vivo* est beaucoup plus faible que celle des autres bactéries à Gram négatif. *L. pneumophila*, *L. micdadei*, *L. bozemanii* possèdent un antigène de virulence *mip* (macrophage infectivity potentiator) dont le gène porté par un plasmide a été cloné et séquencé.

IV - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES INFECTIONS A *LEGIONELLA*

A - Prélèvements utilisés et conditions de transport

La recherche peut être effectuée sur des lavages broncho-alvéolaires de préférence ou sur des ponctions transtrachéales, des biopsies pulmonaires, des culots de centrifugation de liquide pleural, des hémocultures, des fragments d'organes divers, éventuellement des urines, des selles.

Tous ces prélèvements seront recueillis le plus stérilement possible pour éviter une contamination. Pour prévenir la dessiccation on ajoutera un peu d'eau stérile (ne pas employer de sérum physiologique qui risque d'inhiber la culture). De même, lors du prélèvement, il est préférable d'éviter les anesthésiques locaux (lidocaïne).

Si le délai de transport au laboratoire excède 30 minutes, il est conseillé de conserver le prélèvement à + 4°C. Si l'acheminement est différé de plus de 24 ou 48 heures, le prélèvement sera congelé à -20°C au minimum. Ces précautions sont valables pour les cultures et pour les recherches par immunofluorescence directe.

B - Recherche de *Legionella* par immunofluorescence directe dans les produits pathologiques

1. Principe

On utilise des anticorps dirigés contre les diverses espèces et différents sérogroupes de *Legionella*. Il existe également un anticorps monoclonal spécifique de l'espèce *Legionella pneumophila* qui reconnaît un antigène protéique situé sur la membrane externe de tous les sérogroupes connus de *L. pneumophila*. Ces anticorps sont conjugués à de la fluorescéine.

Chez un malade traité depuis moins de 3 jours, cet examen est encore possible quoique moins sensible, mais la lecture est plus difficile, les corps bactériens perdant leur morphologie habituelle. De plus il existe une fluorescence de fond due à la lyse bactérienne.

L'IFD peut être pratiqué sur les produits frais ou conservés dans le formol ou dans la paraffine.

2. Réalisation pratique

On effectue plusieurs frottis en couche mince, l'un est coloré par la technique de Gram pour apprécier la flore dominante. A noter que les *Legionella* ne sont pas visualisées par la coloration de Gram usuelle. Cette bactérie est colorée au Gram en utilisant de la fuschine phéniquée basique. Il apparaît alors Gram négatif.

Pour l'IFD on utilise généralement 3 pools de conjugués fluorescents :

- A : *L. pneumophila* sérogroupes 1, 2, 3 et 4.
- B : *L. pneumophila* 5 et 6, *L. dumoffii*, *L. longbeachae* 1.
- C : *L. gormanii*, *L. micdadei*, *L. longbeachae* 2, *L. bozemanii*.

L'examen sera dit positif si on voit plus de 5 petits bacilles franchement fluorescents (vert pomme) et ayant une morphologie typique (souvent incurvés, polymorphes). Ces bacilles sont intra et extra-leucocytaires.

3. Intérêt - Limites

L'intérêt majeur de cette technique est sa rapidité (environ 1 h). Sa sensibilité est médiocre et fonction du prélèvement examiné (30 à 50 %).

Un examen négatif ne doit donc pas faire éliminer ce diagnostic, il est obligatoire de pratiquer des cultures.

La spécificité est bonne, mais il peut exister quelques réactions croisées avec *Pseudomonas*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis*. La spécificité est améliorée par l'emploi d'anticorps monoclonaux.

C - Culture et isolement

1. Milieux de culture

Legionella ne peut être cultivée sur les milieux usuels. Divers milieux ont été successivement utilisés. Actuellement on n'utilise plus que le Buffered Charcoal Yeast Extract additionné d'acide alpha-céto-glutarique ou BCYE alpha incubé à 35°C sous 2,5 à 5 % de CO₂.

Ce milieu est rendu sélectif par l'adjonction de différents antibiotiques. On utilise le plus souvent un mélange : vancomycine, céfamandole, polymyxine B, anisomycine. Pour les prélèvements de l'environnement on a préconisé d'ajouter un mélange : glycine, vancomycine, polymyxine (milieu GVP).

Dans la préparation de ces milieux, il est indispensable d'apporter une attention particulière à la qualité des ingrédients et à leur ordre d'adjonction ainsi qu'aux conditions de pH final qui doit être rigoureusement compris entre 6,85 et 6,95. L'inoculation au cobaye a longtemps été utilisée. Ses résultats sont tardifs.

2. Réalisation pratique

Avant l'ensemencement, il peut être utile de décontaminer les prélèvements pluri-microbiens tels que aspirations trachéales ou lavages broncho-alvéolaires. Pour ce faire, le prélèvement est traité par un tampon HCl - KCl à pH 2,2. Dans le cas de contamination par *Pseudomonas aeruginosa*, on traitera le prélèvement par la chaleur (1 à 2 mn à une température inférieure ou égale à 60°C).

Chaque prélèvement est ensuite ensemencé sur 6 boîtes de milieu BCYE-alpha : 3 BCYE-alpha simple et 3 BCYE-alpha sélectif. Chacune des boîtes de ces deux milieux est ensemencée avec le prélèvement pur, dilué à 10² et à 10⁴ en eau distillée afin de diminuer la concentration des inhibiteurs naturels présents dans les produits, d'éventuels antibiotiques et de contaminants.

En ce qui concerne les prélèvements sanguins, *Legionella* peut croître dans des milieux spéciaux pour hémoculture (Bactec).

3. Isolement et identification

al Morphologie et structure de la bactérie



Ce sont des bacilles courts ou des cocco-bacilles de 1 à 2 µm de long sur 0,5 à 0,7 µm de large, aérobies stricts. *In vitro*, on observe des bactéries filamenteuses (jusqu'à 100 µm de long).

Ils sont mobiles par un flagelle polaire unique.

In vivo, ils peuvent être intracellulaires.

bl Caractères cultureux

Il s'agit d'un bacille de culture difficile ne poussant que lentement (2 à 15 jours en moyenne, voire plus dans les hémocultures). La croissance est optimale pour une température de 35°C, les limites se situant entre 25 et 48°C.

C'est un germe aérobic strict, exigeant en cystine et en fer, qui pousse mieux en présence de 2,5 à 5 % de CO₂.

Les boîtes de Pétri seront examinées tous les jours (pendant 15 jours) à la loupe binoculaire. Quand les colonies apparaissent, elles ont un aspect typique dit en verre frite et peuvent être pigmentées (du bleu au rosé selon les espèces), pigment plus intense en lumière UV. Cet aspect typique, mais non spécifique n'est généralement observé que pendant 24 h. Toutes ces colonies seront prélevées et réensemencées sur BCYE-alpha dépourvu de cystine et sur gélose au sang.

Une identification du genre *Legionella* peut alors être faite quand les arguments suivants sont réunis :

- aspect typique de culture sur BCYE-alpha,
- absence de culture sur BCYE-alpha dépourvu **de L-cystine, sauf pour** *L. jordanis* et *L. oakridgensis*.
- absence de culture sur gélose au sang.

L'identification de l'espèce peut parfois être réalisée à l'aide de différents caractères biochimiques. On retiendra de l'espèce un caractère toujours positif (la catalase) et des caractères toujours négatifs : acidification des hydrates de carbone, nitratase, uréase (tableau II). La confirmation nécessitera souvent l'analyse des acides gras ramifiés en chromatographie en phase gazeuse (GLC), des ubiquinones en CLHP, voire l'étude du génome par hybridation ADN/ADN.

TABLEAU n
CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES PRINCIPALES ESPÈCES DE *LEGIONELLA*

	Oxydase	Géladnase	B-lactamase	Hydrolyse de l'hippurate	Besoin en cystéine
<i>L. pneumophila</i>	+	+	+	+	+
<i>L. longbeachae</i>	+	+	+	-	+
<i>L. oakridgensis</i>	-	+	±	-	-
<i>L. micdadei</i>	±	-	-	-	+
<i>L. dermoffii</i>	-	+	+	-	+
<i>L. gormaii</i>	-	+	+	-	+
<i>L. bozemanii</i>	-	+	+	-	+
<i>L. jordanis</i>	+	+	+	-	±
<i>L. wadsworthii</i>	-	+	+	-	+
<i>L. anisa</i>	+	+	+	-	+
<i>L. feelei</i>	-	-	-	faible	+
<i>L. sainthelensi</i>	+	+	+	-	+
<i>L. birminghamensis</i>	±	+	+	-	+
<i>L. cincinnatiensis</i>	-	+	+	-	+
<i>L. maceachernii</i>	+	+	-	-	+

cl Intérêt de l'isolement

Seul l'isolement du germe permet une certitude diagnostique absolue. De plus, l'isolement de *Legionella* constitue le seul argument diagnostique biologique lorsque l'IFD et la sérologie sont négatives.

La comparaison des souches isolées chez les malades et dans leur environnement a un intérêt épidémiologique majeur pour déterminer l'origine exacte de la contamination.

D - Sérologie par immunofluorescence indirecte (IFI)

1. Principe

L'antigène est, soit *Legionella* cultivée sur oeuf embryonné et tuée par le formol (antigène de Taylor, le plus utilisé en Europe en raison de sa plus grande sensibilité), soit *Legionella* cultivée sur milieu artificiel et tuée par le formol et la chaleur (antigène de Wilkinson).

L'antigène est fixé par l'acétone sur lame. La technique utilisée est celle de l'IFI habituelle en utilisant un conjugué fluorescent anti-gamma-globulines humaines totales.

2. Réalisation pratique

On prélève un premier sérum le plus tôt possible, puis un sérum tous les 8 jours (pendant 6 à 8 semaines parfois) pour observer une éventuelle **séroconversion parfois tardive**.

Compte-tenu du nombre d'espèces et de sérogroupes de *Legionella*, il est matériellement impossible de tester en routine les sérums vis-à-vis des antigènes correspondant à toutes les espèces de *Legionella* connues. Cette étude sérologique est facilitée par l'existence de réactions croisées entre différents sérogroupes de *L. pneumophila* et des réactions croisées entre différentes espèces de *Legionella*.

En pratique, on utilise des pools d'antigènes : *L. pneumophila* 1 à 4 et 5-6 ainsi que l'antigène monovalent *L. pneumophila* 1. En cas de positivité vis-à-vis d'un pool d'antigènes, un titrage est effectué vis-à-vis de chacun des antigènes monospécifiques. Pour *L. pneumophila* et en utilisant l'antigène de Taylor, le diagnostic est considéré comme certain lorsque le titre d'anticorps s'élève de moins de 1/16^e à plus de 1/64^e et comme très probable lorsque le titre est stable à 1/128^e.

3. Intérêt

Il permet souvent de confirmer une suspicion clinique du diagnostic et est parfois le seul moyen de confirmer un diagnostic.

La sensibilité avoisine 80 %. Avec l'antigène de Taylor, la spécificité est bonne. Il est à noter qu'il existe des faux positifs (*Chlamydia* et *Mycoplasma*, *Pseudomonas*).

La recherche d'IgM n'a pas d'intérêt pour cette sérologie.

E - Autres techniques

1. Détection des anticorps par agglutination sur lame

Cette technique facile d'emploi est intéressante pour *L. pneumophila* avec des résultats **proches** de l'IFI ; mais il existe de nombreuses réactions croisées entre les autres espèces de *Legionella*.

2. Détection des antigènes solubles par ELISA

Les antigènes solubles de *L. pneumophila* 1 peuvent être détectés dans le sérum et les urines à l'aide d'un test ELISA utilisant des anticorps polyclonaux **et** monoclonaux.

La sensibilité dans les urines est proche de 80 % et la spécificité de l'ordre de 99 %.

3. Autres méthodes de détection

L'amplification génique *in vitro* pourrait aboutir prochainement à une amélioration du diagnostic direct de cette bactérie.

V - TRAITEMENT - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

In vitro, *L. pneumophila* est sensible à la rifampicine, au céfotaxime, à l'érythromycine, aux aminosides, aux tétracyclines, au chloramphénicol, aux pénicillines, aux nouvelles quinolones. Ce germe produit souvent une bêta-lactamase active sur les céphalosporines.

Ces données ne coïncident pas avec les résultats cliniques et le traitement classique est basé sur l'érythromycine par voie intra-veineuse actuellement associée à la rifampicine. Les fluoroquinolones sont de plus en plus employées seules ou en association.

CONCLUSION

Les *Legionella* représentent actuellement 5 à 10 % des étiologies des pneumopathies atypiques, et sont à ce titre responsables d'une évolution défavorable chez un certain nombre de patients immunodéprimés.

Leur isolement est actuellement à la portée de tout bon laboratoire qui veut s'en donner les moyens. Par contre, cet isolement étant long et fastidieux, il faut que ces demandes d'examen soient justifiées par une réelle suspicion clinique.

BIBLIOGRAPHIE

- BORNSTEIN N., MARMET D., SURGOT M., FLEURETTE J., « Le diagnostic bactériologique et sérologique des légionelloses », *Annales du Contrôle de qualité national en bactériologie*, 1989.
- BRENNER D.J. *et al.*, « Ten new species of *Legionella* », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1985, 35, n°1, 50-59.
- DESPLACES N., NAHAPETIAUX K., DOURNON E., « Inventaire des *Legionella* dans l'environnement parisien », *Presse Méd.*, 1984, 13, n° 31, 1875-1879.
- DOURNON E., BURE A., DESPLACES N., MEYOHAS M. C., CHRISTOL D., « Le diagnostic biologique de la maladie des Légionnaires en 1983 », *Méd. et Hyg.*, 1983, 41, 1017-1024.
- EDELSTEIN P. H., « Environmental aspects of *Legionella* », *ASM News*, 1985, 51, 9, 460-467.
- EDELSTEIN P. H., « Laboratory diagnosis of infections caused by *Legionellae* », *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1987, 6, 4-10.
- FLEURETTE J., « Légionellose », *EMC Paris, Maladies Infectieuses*, 1982, 8021 A10, 4.
- MAHBUBANI M.H., BEJ A.K., MILLER R., HAFF L., DICESARE J., ATLAS R.M., « Détection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gène probe methods », *Mol. Cell. Probes*, 1990, 4, 175-187.
- WINN W.C., « Légionnaires disease : Historical perspective », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, 1, 60-81.

A signaler : "Colloque *Legionella*" Lyon Mai 1987, OMS - LNS - SFM, (J. Fleurette, N. Bornstein, D. Marmet, M. Surgot eds). *Collection Fondation Marcel Mérieux*, 379 p.

"*Legionella*" Proceedings of the 2nd International Symposium. (C. Thomsberry, A. Balows, J.C. Feeley, W. Jakubowski eds), *American Society for Microbiology*, Washington D.C., 1984, 371p.

Chapitre XXVII

BORDETELLA

HISTORIQUE

En 1900, Bordet décrivait un bacille à Gram négatif comme agent de la coqueluche.

En 1906, Bordet et Gengou ont réussi à faire pousser ce bacille sur un milieu gélose peptoné à base de pomme de terre et additionné de sang.

La coqueluche a été longtemps une cause importante de mortalité infantile. La vaccination a permis de faire disparaître en France cette cause de mortalité. Néanmoins des épidémies pourraient réapparaître si la vaccination n'était pas suffisamment appliquée.

I - DÉFINITION ET CLASSIFICATION

Les *Bordetella* sont des coccobacilles (0,5 à 1 µm de long et 0,2 à 0,4 µm de large) à Gram négatif, disposés seuls ou par paires mais rarement en courtes chaînettes ;

- aérobies stricts, à métabolisme respiratoire ;
- ne fermentant aucun hydrate de carbone et ne produisant pas de gaz ;
- exigeants en nicotinamide et en dérivés soufrés (cystéine), mais pas en facteur **X** ou **V** ;
- leur G + C % est compris entre 61 et 70 ;
- ayant un tropisme pour les muqueuses respiratoires des mammifères.

Trois espèces principales, dont l'homologie ADN/ADN est très voisine, sont rencontrées chez l'homme : *B. pertussis*, *B. parapertussis* et *B. bronchiseptica*.

B. aviwn est une espèce isolée chez les dindes et les dindonneaux.

II - POUVOIR PATHOGÈNE

La coqueluche, maladie infectieuse des voies respiratoires supérieures, est généralement due à *B. pertussis*. Après une incubation silencieuse d'environ une semaine, la période d'invasion est marquée par un catarrhe rhino-trachéo-bronchique qui constitue la phase la plus contagieuse. Elle est suivie par la période des quintes où le diagnostic clinique est évident en raison de la toux paroxystique (chant du coq). Atteignant surtout les jeunes enfants, la coqueluche chez le nourrisson de moins de 3 mois est une maladie grave parfois mortelle, la mort survenant par asphyxie. Les infections secondaires et les complications neurologiques sont à redouter.

B. parapertussis peut aussi être responsable de syndromes coquelucheux.

B. bronchiseptica est un pathogène des voies aériennes supérieures des animaux domestiques, responsable de la rhinite atrophique du porc. Rarement isolée chez l'homme, cette bactérie provoque des pseudocoqueluches.

III - HABITAT - ÉPIDÉMIOLOGIE

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

La coqueluche évolue selon un mode endémo-épidémique. Dans les pays où la protection vaccinale est bonne, les épidémies sont rares. Par contre dans les pays où le taux d'immunisation des enfants est faible (inférieur à 50 %), des épidémies importantes peuvent survenir. Plus de 100 000 cas de coqueluche ont été observés en Grande-Bretagne en 1977. En 1982 plus de 1 000 cas par semaine y étaient notifiés. En France on estime à 1000 par an le nombre de cas de coqueluche hospitalisés. Il s'agit d'enfants de moins de un an.

On a constaté une recrudescence de la coqueluche en Australie à partir de 1987. L'incidence de la coqueluche dans les pays européens a diminué en grande partie grâce à la vaccination alors que cette maladie serait en augmentation aux USA.

B. pertussis a aussi été isolée fortuitement chez des malades atteints de Sida dont les sécrétions bronchiques avaient étéensemencées sur milieu BCYE pour recherche des *Legionella*.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE

La coqueluche, toxi-infection à *B. pertussis* est une maladie essentiellement broncho-pulmonaire, le bacille a un tropisme pour les cellules ciliées de l'épithélium respiratoire. Les bactéries adhèrent aux cils vibratiles des cellules, provoquent une paralysie des cils et une activation des sécrétions muqueuses. Les cellules lésées et les sécrétions sont éliminées par la toux.

A la phase d'état de la maladie, il n'y a plus de *B. pertussis* viables dans les sécrétions. Les signes cliniques observés sont alors dus à des facteurs de virulence libérés par la bactérie.

B. pertussis possède plusieurs antigènes, un antigène capsulaire polysidique, un antigène somatique thermostable correspondant à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif.

Plusieurs facteurs de virulence sont produits :

— **la toxine pertussique** (PT), c'est une toxine protéique libérée partiellement par le germe (différents synonymes ont été employés pour désigner cette toxine, reflétant ses diverses activités : HSF, histamine-sensitizing factor, LPF, lymphocytosis-promoting factor et IAP, islet-activating protein). Cette protéine oligomérique de 117 kDa agit sur différentes cellules eucaryotes en augmentant la concentration intra-cellulaire de l'AMPc (en particulier dans les cellules épithéliales du tractus respiratoire). Elle agit sur le site régulateur négatif (G-protéine) de l'adénylate-cyclase membranaire en levant l'inhibition de cette enzyme par une réaction d'ADP-ribosylation. Elle provoque une hyperlymphocytose qui est un signe clinique important dans cette maladie.

— **l'adénylate-cyclase** exocellulaire de *B. pertussis* est excrétée sous la forme d'une protéine de 200 kDa dont un fragment de 43 kDa correspond à l'adénylate-cyclase, les autres parties possédant des fonctions de fixation et d'intériorisation, elle possède

une activité hémolytique, elle est activée par la calmoduline intra-cellulaire. Son rôle essentiel est d'augmenter le pool d'adénylate-cyclase intra-cellulaire et de diminuer les fonctions phagocytaires des polynucléaires et des macrophages.

— **les hémagglutinines** sont impliquées dans l'attachement de *B. pertussis* aux cellules épithéliales. L'hémagglutinine filamenteuse ou FHA, est portée par des pili.

— **d'autres toxines** ont été décrites : une toxine dermonécrotique (HLT = heat labile toxin), une cytotoxine trachéale (TCT = trachéal cytotoxin) agissant sur les cellules ciliées.

V - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA COQUELUCHE

A - Isolement et identification de *B. pertussis*

1. Le prélèvement

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

Le recueil des mucosités se fait soit à l'aide d'un écouvillon souple en alginate de calcium ou en dacron, introduit par la narine jusqu'à la fosse nasale postérieure, soit à l'aide d'une sonde souple montée sur une seringue. Les autres méthodes de recueil sont à déconseiller car elles donnent des résultats très inférieurs.

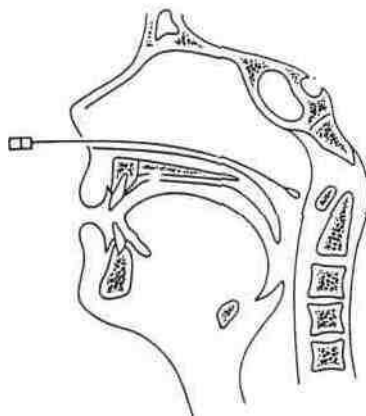


SCHÉMA
RECUEIL DES MUCOSITÉS

2. Milieu de culture

Les milieux de culture doivent être ensemencés sans délai, au lit du malade ou à défaut en utilisant un milieu de transport (milieu de Regan et Lowe ou Stainer et Scholte).

Au sortir de l'organisme, *B. pertussis* ne pousse pas sur gélose ordinaire.

- **Le milieu de Bordet-Gengou**

C'est un milieu gélose empirique constitué d'une infusion de pomme de terre, de glycérine et de NaCl auquel est ajouté 15 % de sang frais stérile défibrine de cheval, de mouton ou de lapin.

Le rôle du sang est de neutraliser certains inhibiteurs de la croissance de *B. pertussis*, tels les acides gras. Dans le milieu de Regan on ajoute également du charbon activé.

Le milieu peut être rendu sélectif par addition de méticilline à la concentration finale de 2,5 µg/ml ou mieux de la céfalexine à la concentration finale de 40 (Ag/ml).

Il existe également un milieu synthétique liquide, le milieu de Stainer et Scholte.

- *Incubation*

Elle se fait à 35-36°C pendant 7 jours. Il est important d'utiliser un système permettant d'éviter la dessiccation de la gélose (ruban adhésif, papier d'aluminium ou jarre) pour réaliser une atmosphère humide favorable à la croissance.

3. *Observation des colonies*

B. pertussis pousse lentement. Les colonies apparaissent rarement avant le 3^e jour d'incubation.

- Au sortir de l'organisme les colonies sont minuscules, lisses, bombées, ont un aspect en « gouttes de mercure ». Elles s'entourent progressivement d'une zone d'hémolyse. Cela correspond à la phase I. Les colonies sont smooth et les corps bactériens coccoïdes.
- Après repiquage, les colonies prennent un aspect rugueux et poussent sur gélose ordinaire. Cela correspond à la phase IV, ou formes rough. Les corps bactériens peuvent être filamenteux.

4. *Identification de B. pertussis*

L'identification est délicate compte tenu de nombreux caractères négatifs pour ce bacille. La recherche de l'**oxydase** est positive. Les différents caractères sont indiqués dans le tableau. L'identification peut être complétée ou confirmée par un test d'agglutination sur lame utilisant un sérum anti *B. pertussis*.

De même, on peut identifier *B. pertussis* par immunofluorescence directe à partir des colonies. Il a été décrit une aide à l'identification par la détermination des acides gras cellulaires par chromatographie en phase gazeuse.

B - Autres méthodes de diagnostic

- *L'immunofluorescence directe*. Faite sur les mucosités, c'est un examen qui a l'avantage de la rapidité de la réponse, mais son interprétation demande de l'habitude et il est moins sensible que la culture. L'interprétation est délicate et sujette à des erreurs, elle est fonction de l'expérimentateur. Il peut y avoir des faux positifs (réaction croisée avec *Legionella*) et des faux négatifs. On peut trouver 70 % de positivité dans les formes datant de moins de 3 semaines et seulement 10 % après la prise d'érythromycine.

- *La mise en évidence des anticorps sériques* est un examen dont le résultat tardif a peu d'intérêt pour le diagnostic. Un test ELISA a été développé mais ne peut remplacer la culture et il faut remarquer que cette technique est très peu performante chez les enfants de moins de 4 mois. Une recherche des IgA anti *B. pertussis* a été proposée à partir des sécrétions rhinopharyngées.

- La recherche de l'adénylate cyclase produite par le germe (AÇ)

Elle est réalisée à partir du frottis naso-pharyngé, immergé immédiatement pendant quelques secondes dans le milieu de Stainer et Scholte auquel sont ajoutés de l'ATP et de la calmoduline. Le milieu est incubé 18 heures à 37°C : l'AMPc formé est mesuré par une méthode de radiocompétition. Cette méthode, récemment introduite, est sensible, fiable et surtout rapide. Elle est d'une grande utilité pour le diagnostic de coqueluche chez les nourrissons de moins de 3 mois et les enfants immunodéprimés.

Les perspectives de diagnostic s'amélioreront avec la mise en évidence dans les prélèvements de PT ou/et FHA à l'aide d'anticorps monoclonaux et l'apport de sondes oligonucléotidiques de synthèse (gènes de PT ou FHA) et par amplification génique *in vitro* (PCR).

TABLEAU

TEST	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Délai de croissance sur milieu de Bordet-Gengou	3-5 jours	2 jours	1 jour
Croissance sur gélose nutritive	- ^a	- ^a	+
Mobilité	-	-	+
Oxydase	+	-	+
Uréase	-	+	+
Nitrate-réductase	-	-	+

a) : Seuls les variants avirulents se développent ; ils produisent un brunissement du milieu dans le cas de *B. parapertussis*.

VI - AUTRES *BORDETELLA*

A - *Bordetella parapertussis*

Elle se caractérise par :

- sa croissance plus rapide (36 à 48 heures) sur gélose de Bordet-Gengou avec un halo d'hémolyse net
- une **uréase** (24 h)
- une subculture plus facile sur gélose nutritive ou en bouillon
- un brunissement de la gélose de Bordet-Gengou due à la présence d'une tyrosinase.

B - *Bordetella bronchiseptica*

Se reconnaît par :

- sa croissance facile et rapide (24 h) sur gélose ordinaire
- la croissance sur gélose de Mac Conkey
- la culture sur milieu au citrate de Simmons
- sa mobilité due à une ciliature péritriche
- la réduction des nitrates en nitrites (milieu supplémenté en NAD)
- la présence d'une uréase très active (1 à 4 h), ce qui la distingue de *Alcaligenes*.

Des souches responsables de rhinotrachéite du dindon ont été désignées comme « *B. bronchiseptica-like* ». Elles se distinguent par l'absence de nitrate-réductase en milieu classique (mais cette réaction est positive si on ajoute du NAD) et d'uréase. Elles sont aujourd'hui désignées comme *B. avium*.

VII - VACCIN ANTICOQUELUCHEUX

A - Préparation et modalités d'administration

C'est une suspension contenant 5 milliards de *B. pertussis* par ml, inactivée par un chauffage à 56°C.

Il peut être administré à l'enfant dès l'âge de 3 mois (entre le 3e et le 6e mois) en sous-cutanée profonde à raison de 3 injections espacées d'un mois et un rappel après un an. Il peut être associé à d'autres vaccins.

B - Efficacité

La vaccination a pratiquement fait disparaître en France les épidémies de coqueluche et la mortalité due à cette maladie.

Le vaccin confère une immunité de 3 à 4 ans dont la qualité peut varier d'un lot de vaccin à l'autre. Il entraîne une augmentation des agglutinines, mais il n'y a pas de parallélisme avec le degré de protection. La couverture vaccinale est de 80 à 95 % après 3 injections.

C - Critères d'activité

Cette activité est jugée classiquement par une épreuve de survie de **souris** immunisées après injection intracérébrale de *B. pertussis*.

L'activité d'un lot de vaccin est comparée à celle d'un vaccin de référence par la mesure de survie chez des souris immunisées. Elle s'exprime en unités internationales et doit être supérieure ou égale à 4 UI.

Un modèle de protection de la souris contre une infection respiratoire par aérosol a été mis au point plus récemment. Il permet de juger de l'efficacité des antigènes protecteurs.

D - Inconvénients et contre-indications

Le vaccin anticoquelucheux peut entraîner des réactions locales ou générales (fébricule). Mais ce sont les accidents neurologiques (encéphalopathies), dont le risque est évalué à environ 1 pour 300 000 vaccinés, qui sont la cause de désaffection pour ce vaccin dans certains pays. Le risque d'accident vaccinal grave est nettement inférieur au risque de mortalité par la coqueluche. Les antécédents neurologiques, même de « simples convulsions hyperpyrétiques » sont une contre-indication à la vaccination.

E - Perspectives

Le vaccin actuel constitué par des corps bactériens entiers inactivés est efficace mais empirique. L'emploi de fractions bactériennes plus immunogènes et mieux tolérées comme la toxine pertussique ou l'hémagglutinine filamenteuse est toujours en cours d'étude. Deux vaccins acellulaires sont développés, l'un au Japon, l'autre en France, basés principalement sur deux antigènes FHA et toxine détoxifiée, leur efficacité sérologique est certaine mais la valeur protectrice des anticorps est difficile à apprécier en raison de la difficulté de comparer deux populations et de la régression du nombre de cas de coqueluche.

VIII - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

L'antibiothérapie n'a pas une influence significative sur l'évolution d'une coqueluche déclarée dont les signes cliniques sont dus à des facteurs toxiques plus qu'à la présence de bactéries.

B. pertussis est résistant à la pénicilline et à la bacitracine.

Les antibiotiques actifs *in vitro* sont : l'érythromycine, la rifampicine, les tétracyclines, les céphalosporines de 3e génération, le chloramphénicol, les fluoroquinolones, le co-trimoxazole et la gentamicine. Il semble que l'érythromycine soit l'antibiotique le plus actif pour prévenir l'infection chez des sujets qui ont été en contact avec des coquelucheux.

BIBLIOGRAPHIE

- ALONSO J.M., BREZIN C., RAY B., « *Bordetella pertussis* et la coqueluche », *Bull. Inst. Pasteur*, 1985, **83**, 19-31.
- ALONSO J.M., « Le diagnostic bactériologique des infections à *Bordetella* », *Méd. Mal. Infect.*, 1986, **16**, 432-435.
- FRIEDMAN R.L., « Pertussis : the disease and new diagnostic methods », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 365-376.
- GILLIGAN P.H., FISHER M.C., « Importance of culture in laboratory diagnosis of *Bordetella pertussis* infections », *J. Clin. Microbiol.*, 1984, **20**, 891-893.
- HALPERIN S.A., BORTOLUSSI R., WORT A.J., « Evaluation of culture, immunofluorescence, and serology for the diagnosis of pertussis. » *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 752-757.
- MICHEL-BRIAND Y., « *Bordetella* » in *Le Minor et Véron, Bactériologie Médicale*, Flammarion, Paris, 1990, 678-691.
- ROBBINS J.B., « Toward a new vaccine for pertussis », in *Microbiology*, American Society for Microbiology, Leive L. and Schlessinger D., Editors, Washington D.C., 1984, 176-183.

Chapitre XXVffl

FRANCISELLA TULARENSIS

Francisella tularensis a été isolée après la survenue d'une maladie nouvelle, pseudo- peste de l'écureuil, observée dans le Comté de Tulare en Californie en 1911. En 1921, Francis, bactériologiste américain, étudie l'agent causal et la pathogénie et fait le rapprochement avec une maladie connue chez le lapin et les bovins depuis le début du siècle dans l'Ouest américain. Il **reconnait** le premier cas humain après contamination de laboratoire.

1 - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

. Il s'agit d'un bacille de petite taille (0,2 x 0,2-0,7 μm), polymorphe, à **Gram** négatif, à coloration bipolaire et immobile.

Aérobic strict, sa culture est lente sur milieux spéciaux enrichis.

Il est catalase positive, oxydase négative, produit du SH_2 et acidifie certains sucres sans production de gaz.

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

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

La tularémie est une maladie animale occasionnellement transmise à l'homme. *F. tularensis* a une large distribution limitée à l'hémisphère Nord, mais les régions où les infections sont les plus fréquentes sont l'Amérique du Nord, aux U.S.A. et l'U.R.S.S., dans les républiques du Sud.

La bactérie a pu être isolée chez plus d'une centaine d'animaux sauvages et dans l'eau des zones où vivent ces animaux. Tous les mammifères, sauf l'homme, font une septicémie et les bactéries sont présentes partout au niveau du cadavre.

En France, les cas humains surviennent dans la majorité des cas (99 %) après un contact avec un **lièvre malade** ou un cadavre de lièvre. La contamination se fait par voie cutanée (la taille de la bactérie lui permettant de traverser la peau saine) ou par voie muqueuse, oculaire ou digestive (pharyngée). La contamination peut survenir beaucoup plus rarement après piqûre d'insecte, inhalation, morsure (chien, taupe,...), immersion en eau douée.

La maladie est apparue dans l'Est de la France en 1946 et s'est implantée dans différentes régions, Alsace, Indre, Périgord où elle est observée sur un mode sporadique. La contamination humaine est liée à la maladie du lièvre et à la survenue d'épizooties. Elle sera théoriquement plus fréquente en période d'ouverture de la

chasse et des cas survenant en dehors de cette période pourront ne jamais trouver d'explications satisfaisantes (braconnage...).

La maladie est peu fréquente, avec une estimation de 20 cas humains environ en France en 1986.

III - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Après 4-6 jours d'incubation survient une manifestation locale au point de pénétration (cutané, oculaire, pharyngé), plus ou moins fébrile (pseudo-grippal), accompagnée d'une réaction ganglionnaire. Selon la porte d'entrée, différents tableaux sont possibles :

- forme ulcéro-ganglionnaire des membres, la plus fréquente ; le plus souvent au niveau des membres supérieurs avec des lésions cutanées vésiculo-pustuleuses et une adénopathie axillaire volumineuse qui évolue vers une suppuration stérile traînante ;
- forme oculaire rare, avec conjonctivite unilatérale douloureuse et adénopathie pré-auriculaire ;
- forme amygdalienne, angineuse avec adénopathies sous-maxillaire et jugulo-carotidienne.

IV - PHYSIOPATHOLOGIE - FACTEURS DE VIRULENCE

La bactérie pénètre dans l'organisme par la peau ou les muqueuses, indépendamment de toute lésion. A partir de la zone de pénétration où se développe une petite ulcération, la bactérie infecte le système réticulo-endothélial et gagne par voie lymphatique les ganglions satellites, forme des granulomes et des zones de nécrose (micro-abcédation), rapidement stérilisées avec persistance de la suppuration. La septicémie, qui est la règle chez l'animal, n'est jamais observée chez l'homme. Dans l'organisme les souches virulentes possèdent une capsule qui ne semble ni immunogène ni toxique.

L'infection naturelle confère une immunité qui va persister plusieurs années. Les anticorps agglutinants restent à un titre élevé pendant longtemps.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

À - Produits pathologiques

Au début de la maladie, la bactérie est présente au niveau de la sérosité de la lésion locale. Au niveau du ganglion la bactérie est présente pendant un temps court et l'auto-stérilisation survient après moins d'une semaine d'évolution.

B - Examen direct

F. tularensis est un petit bacille à Gram négatif, à coloration bipolaire, mieux visible après coloration de Giemsa. Les souches virulentes possèdent une capsule.

C - Culture

Cette bactérie ne peut pas être cultivée sur les milieux usuels qui doivent être enrichis avec de la cystéine ou de la thiamine et des globules rouges (humains, de lapin

ou de mouton) (milieu de Francis, gélose ordinaire + cystéine, glucose et sang de lapin) ou à base de jaune d'œuf. La culture est réalisée à 37°C en aérobiose et les colonies apparaissent en 2-4 jours. Les risques de contamination à partir des cultures sont très grands et imposent des précautions particulières. En pratique, le diagnostic direct n'est jamais réalisé, sauf dans des laboratoires spécialisés.

D - Identification - Pouvoir pathogène expérimental

En fonction de caractères biochimiques, **deux biovars sont décrits, *F. tularensis* biovar *tularensis* et biovar *palaeartica*.**

Différents animaux, en particulier les rongeurs de laboratoire, sont sensibles à l'infection expérimentale. La souris est sensible et toutes les voies d'inoculation peuvent être utilisées y compris la voie cutanée par simple friction de la peau épilée. Cette technique est précieuse pour les études épidémiologiques ou les recherches à partir de cadavres d'animaux.

E - Diagnostic indirect

La recherche d'anticorps agglutinants est l'élément essentiel du diagnostic biologique. L'antigène est une suspension de bactéries tuées. Les anticorps apparaissent à partir du 10^e jour et atteignent un titre maximal en 1 à 2 mois (1/1000 ou plus) et vont persister pendant des années. Il existe une parenté antigénique avec les *Brucella* et des réactions croisées ont été observées lors de brucellose. Toute présence d'anticorps agglutinants, même à un taux faible, doit être confirmée par l'examen d'un deuxième sérum.

La recherche de l'hypersensibilité à la tularine (autolysat de bactéries chauffées) après injection intra-dermique (tularino-réaction) est spécifique mais n'est plus réalisable par manque de réactif.

VI - TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Les souches sont sensibles aux différents antibiotiques de la famille des aminoglycosides, aux tétracyclines, au chloramphénicol, qui sont utilisés pour le traitement.

La prophylaxie repose sur l'information des personnes exposées (chasseurs, gardes chasse, braconniers !, travailleurs agricoles,...) en particulier lors de manipulation de cadavres d'animaux en zone infectée. Elle repose aussi sur la surveillance sanitaire des lièvres importés de pays d'Europe Centrale pour la repopulation de zones de chasse. Une protection efficace des sujets exposés est obtenue avec un vaccin à base de bactéries vivantes atténuées (utilisé en U.R.S.S.).

SECTION VII — BACTERIES ANAEROBIES

GENERALITES SUR LES BACTERIES ANAEROBIES STRICTES

1 - PHYSIOLOGIE

Les bactéries anaérobies strictes sont des bactéries hypersensibles à l'action de l'oxygène (anoxybiontiques). Elles produisent leur énergie et effectuent leurs réactions de biosynthèse en l'absence de cet accepteur d'électrons.

La plupart (exceptions) ne possèdent pas les enzymes classiques des systèmes dits respiratoires : cytochromes, catalase, peroxydase. Elles produisent leur énergie au cours de processus fermentatifs.

Ces bactéries ne poussent pas en présence de 20 % d'oxygène, donc en présence d'air atmosphérique. Leur degré de sensibilité à l'oxygène est cependant très variable. La plupart des anaérobies strictes ayant un intérêt en pathologie infectieuse sont des anaérobies modérées (tolérant de 0,1 à 5 % d'O₂), d'autres ne tolèrent que des pressions d'oxygène inférieures à 0,1 % (bactéries EOS) (extremely oxygen sensitive bacteria). Les bactéries EOS étudiées chez l'homme de façon très récente, paraissent dénuées de tout pouvoir pathogène et sont des bactéries commensales du tube digestif et de la peau. Elles jouent sans doute un rôle important en raison de leurs potentialités métaboliques, et auraient dans le tube digestif un rôle de barrière vis-à-vis des autres bactéries pathogènes en favorisant l'équilibre de la flore intestinale. Leur étude et leur taxonomie ne rentrent pas dans le cadre de cet ouvrage.

II - MÉTHODES DE CULTURE ET D'IDENTIFICATION

L'étude, la culture et l'identification des bactéries anaérobies ayant un intérêt médical demandent des milieux privés d'oxygène ou dans lesquels le potentiel redox est bas (rh). Les techniques habituelles de la bactériologie sont applicables à la culture et à l'identification des bactéries anaérobies strictes.

Les techniques pour éliminer l'oxygène sont variées :

- milieux liquides portés à ébullition pour chasser l'oxygène (régénération),
- action du vide et remplacement par un gaz inerte,
- milieux solides pré-réduits en atmosphère anaérobie (CO₂ 5 %, H₂ 10 %, N₂ qsp).

La culture est favorisée par la présence de substances réductrices à groupements thiols : thioglycolate, cystéine...

Le milieu étant privé d'oxygène, la culture et l'identification des bactéries anaérobies se poursuivent en évitant le contact avec l'oxygène de l'air ambiant :

- soit dans une verrerie adaptée réalisant le plus petit contact possible avec l'atmosphère : gélose profonde, tube de Veillon, flacons à étranglement pour hémoculture, milieux spéciaux commercialisés pour hémoculture anaérobie avec atmosphère inerte,
- soit par adsorption sur du pyrogallol alcalin (méthode ancienne),
- soit dans de petites enceintes hermétiques (mélange gazeux anaérobie), jarres anaérobies,
- soit par des moyens modernes et plus efficaces qui se développent de plus en plus dans les grands laboratoires : **chambres anaérobies** dites chambres de Fréter.

L'atmosphère anaérobie y est contrôlée : mélange ternaire CO₂ 5 %, H₂ 10 %, N₂ qsp ; thermostatée à 37°C en présence de catalyseur (chlorure de palladium) pour éliminer les traces de O₂. Toutes les opérations bactériologiques après le prélèvement (conservé à l'abri de l'air) y sont effectuées. L'atmosphère d'anaérobiose continue réalisée en chambre anaérobie permet certainement de traiter dans les meilleures conditions les prélèvements pour rechercher les anaérobies.

Le système en **jarres anaérobies** est le plus courant et le mieux adapté aux besoins d'un petit laboratoire. Cependant il faut ouvrir les jarres pour observer les cultures, les repiquer etc... d'où une mortalité importante des cultures. C'est pourquoi on prépare des poches en plastic transparent dans lesquelles on fait l'anaérobiose et qui permettent l'observation des boîtes sans rompre l'anaérobiose.

Les réactions d'identification des bactéries anaérobies strictes font appel aux fermentations classiques d'hydrates de carbone, à la mise en évidence de la production d'enzymes, à la détermination par chromatographie en phase gazeuse des produits finaux des métabolismes fermentaires (ac. acétique, propionique, iso-butyrique, butyrique, iso-valérique, valérique, iso-caproïque, caproïque, heptanoïque) réalisés à partir de milieux de cultures liquides anaérobies standardisés...

Le pouvoir pathogène expérimental sur le cobaye ou la souris permet de reproduire, dans le cas des anaérobies toxigènes, une maladie animale caractéristique de la toxine élaborée par le germe. La neutralisation de l'effet de la toxine par un immunosérum spécifique permet le diagnostic du germe et du type de toxine, rendant ainsi possible dans certains cas d'instituer une sérothérapie spécifique.

III - CLASSIFICATION SCHÉMATIQUE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES (ayant un intérêt en Bactériologie Médicale) (Tableau I)

A côté de nombreuses espèces saprophytes, deux groupes **sont** à l'origine de maladies chez l'homme (ni contagieuses, ni épidémiques) :

- les anaérobies sporulées,
- les anaérobies non sporulées.

TABLEAU 1
APERÇU DE LA CLASSIFICATION DES BACTÉRIES ANAÉROBES STRICTES ET
FRÉQUENCE D'ISOLEMENT DANS LES PRODUITS PATHOLOGIQUES D'ORIGINE
HUMAINE.

	Incidence
Bacilles à Grain négatif non sporulés	24 à 39 %
1) <i>Bacteroides</i> : <i>B. fragilis</i> et <i>B. thetaiotaomicron</i> étant les plus fréquents, <i>B. vulgatus</i> , <i>B. distasonis</i> , <i>B. uniformis</i> , <i>B. ovatus</i> rare	
2) <i>Porphyromonas</i> : <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. intennedia</i> , <i>P. asaccharolytica</i>	
3) <i>Prevotella</i> : <i>P. oralis</i> , <i>P. buccalis</i> et <i>P. veroralis</i> <i>P. bivia</i> , <i>P. disiens</i> , <i>P. oris</i> , <i>P. buccae</i>	
<i>Fusobacterium</i>	4 à 5 %
<i>F. nucleatum</i>	
<i>F. necrophorum</i>	
<i>F. mortiferum</i>	
<i>F. varium</i>	
Cocci à Gram positif	
<i>Peptostreptococcus</i>	16 à 22 %
<i>P. magnus</i>	
<i>P. asaccharolyticus</i>	
<i>P. prevotii</i>	
<i>P. janaerobius</i>	
<i>Peptococcus</i>	5 à 10 %
<i>P. niger</i>	
Cocci à Gram négatif	(variable)
<i>Veillonella parvula</i>	(16% présent essentiellement au niveau du tractus respiratoire)
Bacilles à Gram positif non sporulés	
<i>Actinomyces</i>	rares
(<i>A. israelii</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i>)	
<i>Arachnia</i> sp.	
<i>A. propionica</i>	rares
<i>Bifidobacterium</i>	1 à 3 %
<i>B. dentium</i>	
<i>B. adolescentis</i>	
<i>Propionibacterium</i> sp.	6 à 17 %
<i>P. acnes</i>	
<i>Eubacterium</i> sp.	4 à 6 %
<i>E. lentum</i>	
Bacilles à gram positif sporulés	11 à 14 %
<i>Clostridium</i>	
<i>C. perfringens</i>	
<i>C. ramosum</i>	
<i>C. difficile</i>	
<i>C. septicum</i>	
<i>C. paraputrificum</i>	
<i>C. tertium</i>	
<i>C. sporogenes</i>	
<i>C. histolyticum</i>	
<i>C. novyi</i> , <i>C. tetani</i> , <i>C. botulinum</i>	

À - Anaérobies sporulées. Bacilles telluriques

Genre Clostridium. Bactéries présentes dans le sol et pouvant survivre grâce à leur spore thermorésistante

En pathologie on les rencontre :

- dans les gangrènes gazeuses,
- dans des intoxications et des affections où une toxine neurotrope détermine dans l'organisme des réactions tout à fait caractéristiques : tétanos, botulisme.

Clostridium perfringens peut être l'agent soit de gangrènes gazeuses, soit de septicémies, soit d'entérocolites.

B - Anaérobies non sporulées. Flore de Veillon

La plupart des bactéries anaérobies strictes non sporulées font partie de la flore commensale et saprophyte de l'homme. Elles constituent la flore endogène dite de Veillon, par opposition à la flore précédente d'origine tellurique.

Ces bactéries sont abondantes dans :

- le tube digestif (majeure partie de la flore intestinale),
- cavité buccale, rhino-pharynx,
- partie supérieure de l'appareil respiratoire.

Elles peuvent déterminer, à l'occasion d'un affaiblissement des défenses de l'organisme ou en association avec d'autres germes, soit des infections putrides, soit des septicémies.

IV - CIRCONSTANCES DANS LESQUELLES ON DOIT RECHERCHER DES ANAÉROBIES (Tableau n)

En dehors des intoxications et toxi-infections alimentaires (botulisme et toxi-infection alimentaire à *C. perfringens*) et en dehors du tétanos, on recherchera des germes anaérobies :

- dans toute hémoculture (5 à 10 % peuvent contenir des anaérobies),
- dans toute suppuration fermée surtout lorsqu'elle dégage une odeur fétide,
- lorsque l'on constate du gaz au site de l'infection (crépitation, suspicion de myonécrose),
- dans toute infection secondaire à une morsure, une injection intramusculaire, à un traumatisme, à une intervention chirurgicale (chirurgie digestive, des voies génitales, orthopédique), à une thérapeutique par aminoside et/ou bêta-lactamines se révélant inefficace,
- dans toute infection située à proximité d'une muqueuse (anale, buccale, génitale),
- chaque fois que dans un prélèvement on trouve des germes à Gram (+) ou (-) à l'examen direct, mais que la culture aérobie est négative.

V - FACTEURS FAVORISANT LES INFECTIONS A ANAÉROBIES

Le potentiel redox d'un tissu normal est de $-0,1$ à $0,2$ V, valeur au dessus de laquelle la croissance d'un anaérobie n'est pas possible. La croissance d'un germe anaérobie n'est exponentielle que lorsque ce potentiel redox est plus faible ($-0,5$ V).

Ce potentiel est abaissé par :

- le développement de bactéries anaérobies facultatives,
- un apport insuffisant de l'oxygène : dans les maladies vasculaires (artérite, diabète), traumatisme avec nécrose tissulaire, hématome, corps étranger, injection de certaines substances médicamenteuses à effet vaso-constricteur,

TABLEAU n
INCIDENCE RELATIVE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES
DANS DIVERSES INFECTIONS

	Incidence %
Bactériémies - Septicémies	5-10
Système Nerveux central	
Abscess cérébraux	90
Empyème sous durai	50
Méningites	faible
Tête et cou	
Sinusite chronique	50
Abscess périodontiques	100
Inféodons de la cavité buccale	MD
Sphère pleuro-pulmonaire	
Pneumonies d'aspiration	80-90
Abscess du poumon	90
Pneumonies nécrosantes	85
Empyèmes	75
Bronchites chroniques	MD
Infections abdominales	
Péritonites	90
Abscess hépatiques	50
Infections gynécologiques	
Salpingites, péritonites pelviennes	50
Abscess tubo-ovariens	90
Avortements septiques et endométrites	70
Infections des tissus mous	
Gangrènes gazeuses et myonécroses	100
Cellulites	élevé
Infections urinaires	faible

MD=mal documenté

- un facteur diminuant la résistance de l'organisme et modifiant l'équilibre de la flore bactérienne (cancer, radiothérapie, immunodépresseurs, traitements antibiotiques inadaptés).

BIBLIOGRAPHIE

Les anaérobies. Actualités en 1990. *Médecine et Maladies Infectieuses*. Tome 20. Numéro hors série. Décembre 1990.

Chapitre XXIX

COCCI ANAÉROBIES

Au sein des cocci anaérobies pathogènes pour l'homme, on distingue des cocci :

- à Gram positif : *Peptococcus* et *Peptostreptococcus*,
- à Gram négatif : *Veillonella*.

Ces espèces occupent une place appréciable au sein des bactéries anaérobies strictes isolées en pathologie, puisque les cocci à Gram positif représentent d'après les études françaises entre 11 et 37 % des souches anaérobies rencontrées en milieu hospitalier.

1 - CLASSIFICATION

On distingue parmi les cocci à Gram positif non sporulés quatre genres principaux se différenciant sur les critères regroupés dans le tableau I.

TABLEAU I
CARACTÈRES DIFFÉRENTIELS DES COCCI A GRAM POSITIF ANAÉROBIES

	<i>Rwinnococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Coprococcus</i>
GC %	39-46	27-35*	50-51	39-42
Sucres fermentés	+	V	-	+
Peptones fermentées	-	V	+	-
Produc. butyrate	-	V	V	+
Nombre d'espèces	8	11	1	3
Habitat	rumen	muqueuses, intestin	muq. intestin	rumen,intestin**
Pouvoir pathogène	-	+	+	-

* excepté *P. productus* 44-45

** humain

V = variable

Des remaniements récents ont eu lieu entre *Peptococcus* et *Peptostreptococcus* reposant sur les résultats des GC %, alors qu'auparavant, la distinction se faisait sur la morphologie. Schématiquement :

- les *Peptococcus* sont des cocci en amas, paires, tétrades,
- les *Peptostreptococcus* sont des cocci en chaînettes pour certaines espèces (*P. anaerobius*, *P. micros*, *P. productus*), ils se présentent sous forme d'amas ou de tétrades pour *P. prevotii* et *P. magnus*.

L'espèce *Veillonella parvula* représente la seule espèce de cocci à Gram négatif anaérobie pathogène pour l'homme. Le GC % est de 36-43. Les *Veillonella* sont oxydase (-).

II - HABITAT

Les cocci anaérobies sont largement représentés au sein de la flore normale de l'homme, en particulier au niveau de la bouche, de l'arbre respiratoire, de l'intestin, et du tractus urogénital.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

Les germes sont retrouvés soit isolément, soit en association avec d'autres espèces anaérobies strictes et/ou avec des aérobie.

Les tableaux cliniques sont variés. Ces cocci sont impliqués dans des :

- bactériennes et septicémies (notamment *P. magnus*),
- infections intra-abdominales, post chirurgicales,
- atteintes articulaires (arthrites, souvent sur arthroplasties), ou osseuses (ostéomyélites) notamment *P. magnus*,
- infections dentaires, cervico-faciales,
- infections respiratoires, infections génitales féminines etc...

Les infections à *P. indolicus* sont exceptionnelles chez l'homme.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Caractères morphologiques

Cocci à Gram positif, pouvant parfois prendre un aspect allongé voire coccobacillaire ; ils sont disposés en paires, en petits groupes ou en chaînettes.

La taille des éléments est variable, très petits pour *P. micros* (0,3-0,5 μm), gros pour¹, *magnus* (0,7-1,2 μm).

V. parvula se présente soit en éléments isolés, soit en diplocoques, amas ou courtes chaînettes, les éléments sont de petite taille 0,3-0,5 μm .

B - Caractères culturels

Ces germes se développent facilement sur les différents milieux **usuels en anaérobiose** (cœur-cerveille, Schaedier supplémenté en sang de mouton...).

Dans les prélèvements polymicrobiens, on peut recourir à un milieu sélectif contenant de la néomycine.

P. anaerobius a sa croissance favorisée par une co-culture avec *Clostridium perfringens*, sans que le mécanisme de cette stimulation soit connu.

La culture est relativement lente et l'apparition des colonies demande souvent 48 heures voire plus. *P. niger* élabore un pigment noir sur gélose au sang. Les colonies de *Veillonella* convexes, translucides, donnent une fluorescence rouge en lumière ultraviolette.

C - Caractères biochimiques

La culture lente nécessite souvent un délai de lecture des réactions biochimiques de 3 à 5 jours.

Les principaux critères biochimiques sont regroupés dans le Tableau II.

Des kits rapides peuvent être utilisés : Minitack, API 20A...

L'étude des produits terminaux de fermentation, en chromatographie gaz liquide est également intéressante. Elle révèle notamment la production d'acide butyrique et

caproïque par *P. niger* ; acide butyrique et lactique par *P. tetradius* ; d'acide acétique par tous les autres *Peptostreptococcus*... *V. parvula* produit surtout des acides acétique et propionique.

La sensibilité de *P. anaerobius* au polyanéthol sulfbnate de sodium (SPS) avec une inhibition d'au moins 12 à 18 mm autour des disques du commerce et l'aptitude de cette espèce à dégrader la tyrosine, constituent des éléments d'appoint pour le diagnostic.

EN CHIFFRE

COCCI A GRAM POSITIF ANAÉROBIES

- Ils représentent de 11 à 30 % des anaérobies isolés chez l'homme
 - L'importance relative des espèces parmi l'ensemble des anaérobies est la suivante*
- | | |
|----------------------------|------|
| <i>P. magnus</i> | 13 % |
| <i>P. asaccharolyticus</i> | 5 % |
| <i>P. anaerobius</i> | 3 % |
| <i>P. micros</i> | 2 % |
| <i>P. prevotii</i> | 2 % |

*statistiques de la Mayo Clinic.

COCCI A GRAM NÉGATIF ANAÉROBIES

- *Veillonella parvula* représente selon les auteurs entre 1 et 16 % des isolements anaérobies.

TABLEAU n
IDENTIFICATION DES PRINCIPALES ESPECES DE COCCI ANAÉROBES

Espèces	Gram	Glucose	Saccharose	Lactose	Nitrate	Indole	Coagulase
<i>Peptococcus niger</i>	+			-			
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	+					
<i>asaccharolyticus</i>	+	-				+	
<i>indolicus</i>	+				+	+	+
<i>magnus</i>	+	-		-			
<i>micros</i>	+	-		-	-	-	-
<i>prevotii</i>	+						
<i>productus</i>	+	+	+	+	-	-	ND*
<i>tetradius</i>	+	+	+				
<i>Veillonella parvula</i>	-	-			+	-	

* ND = non déterminé

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Prélèvements : ils doivent être effectués et transportés en respectant les règles générales concernant les prélèvements supposés contenir des anaérobies.

Les prélèvements contenant ces cocci sont variés : hémocultures, pus d'abcès, pus abdominaux, pus osseux, liquides de ponction (articulaire, pleurale...), prélèvements génitaux.

Culture : flacons d'hémocultures anaérobies (de préférence sans SPS), des milieux liquides (Rosenow ou Thioglycolate) et des milieux solides en séparation, non sélectifs

(gélose au sang...), sélectifs pour les cocci à Gram positif (gélose au sang + néomycine ou gentamicine).

L'incubation se fait soit en jarre anaérobie, soit de préférence pour les *Veillonella* en enceinte anaérobie.

Les cultures sont souvent lentes et l'observation doit être poursuivie au moins 3 à 5 jours.

L'identification est basée sur :

- la morphologie, l'examen des colonies en UV,
- les galeries biochimiques, la sensibilité au polyanéthol sulfonate de sodium (SPS),
- l'identification des produits terminaux en chromatographie en phase gazeuse.

VI - SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

La pénicilline G est le traitement de choix des infections dues à ces cocci anaérobies. La clindamycine ou le chloramphénicol représentent des alternatives. Toutes les souches ne sont pas sensibles au métronidazole et les tétracyclines sont peu actives.

BIBLIOGRAPHIE

EZAKI T, YAMAMOTO N, NINOMIYA K, SUSUKI S, YABUCHI E., « Transfer of *Peptococcus indolicus*, *P. asaccharolyticus*, *P. prevotii* and *P. niger* to the genus *Peptostreptococcus* and proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp.nov. ». *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, 33, 683-698.

HOFSTADT T. « Current taxonomy of medically important non sporing anaerobes ». *Rev. Infect. Dis.*, 1990, 12 suppl. 2, S122-S125.

HOLDEMAN MOORE L.V., JOHNSON J.L., MOORE W.E.C., « *Peptococcus. Peptostreptococcus* ». *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt, Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.

HUSS V.A.R., FESTL H., SCHLEIFER K.H., « Nucleic acid hybridization studies and deoxyribonucleic acid base compositions of anaérobies, gram-positive cocci », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, 34, 95-101.

Chapitre XXX

CLOSTRIDIUM

GÉNÉRALITÉS SUR LES CLOSTRIDIUM

Les *Clostridium* sont des bacilles à Gram positif sporulés, anaérobies stricts.

1 - CLASSIFICATION

Parmi les bacilles et cocci à Gram positif formant des endospores, on distingue différents genres :

	Bacilles	Cocci
Aérobies	<i>Bacillus</i> <i>Sporolactobacillus</i> <i>Oscillhspira</i>	<i>Sporosarcina</i>
Anaérobies stricts	<i>Clostridium</i> <i>Desulfomaculum</i>	

L'observation de la spore n'est pas toujours évidente, et pour mettre celle-ci en évidence on utilise les propriétés conférées par cette structure :

- résistance au chauffage à 70°C durant 10 mn,
- résistance à l'éthanol (95 %) à 45°C ou utilisation des milieux favorisant la sporogénèse.

Cette recherche directe ou indirecte de la spore a un intérêt pour différencier les *Clostridium* des autres bacilles à Gram positif anaérobies stricts non sporulés :

- *Eubacterium*
- *Propionibacterium*
- *Bifidobacterium*

qui sont classés dans le Bergey's Manual parmi les « Bacilles non sporulés réguliers ou irréguliers ».

Au sein des *Clostridium*, une classification schématique reposant sur la l'hydrolyse de protéines et la fermentation des glucides est commode pour classer les *Clostridium* en quatre groupes.

Clostridium	Activités		Espèces
	Protéolytique	Glucidolytique	
Groupe I	+	+	<i>C.botulinum</i> (A, B, F), <i>C.sporogenes</i> , <i>C.sordellii</i>
n	+		<i>C.histolyticum</i>
m	faible ou -	+	<i>C.perfringens</i> , <i>C.botitlinum</i> (C,D,E,G)...
IV			<i>C.tetani</i>

La validité de cette classification est confirmée par les résultats obtenus par hybridation ADN-ADN et ADN-ARNr.

L'étude du GC % fait apparaître deux groupes de *Clostridium* :

- le premier, GC % 24-29, regroupe *C. bifermentans*, *C. botulinum*, *C. cadaveris*, *C. difficile*, *C. fallax*, *C. limosum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes* et *C. tétant*,
- le second, GC % 41-49, regroupe *C. innocuum*, *C. sphénoïdes* et *C. symbiosum*.

II - HABITAT

La plupart des espèces de *Clostridium* sont des bactéries telluriques, mais sont également isolées dans l'intestin et les selles de l'homme et de divers animaux. Ainsi la présence de *Clostridium* dans les eaux ou les aliments par exemple signe en général une contamination fécale.

III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

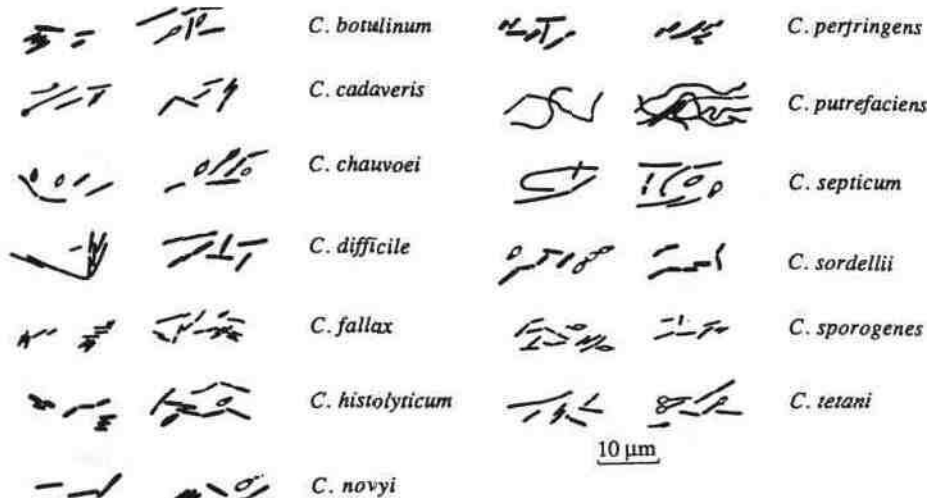
A - Caractéristiques morphologiques : (figure 1)

Ce sont des bacilles à Gram positif, dont la paroi contient habituellement de l'acide méso-diaminopimélique.

Ils sont mobiles par ciliature péritriche ou immobiles.

Ils produisent des endospores ovales ou sphériques qui peuvent déformer la bactérie.

FIGURE 1
MORPHOLOGIE DE QUELQUES ESPÈCES DE CLOSTRIDIUM SUR MILIEUX USUELS



B - Caractéristiques métaboliques

— Ce sont des bactéries anaérobies strictes, dont la tolérance vis-à-vis de l'oxygène varie selon les espèces, quelques espèces peuvent (sans sporuler) pousser en présence d'oxygène.

— Les *Clostridium* sont usuellement dépourvus de catalase.

— Les *Clostridium* produisent habituellement des acides organiques et des alcools à partir des hydrates de carbone et des peptones. La connaissance du comportement des espèces sur le plan :

- de la protéolyse, de la production d'indole, la possession d'une uréase,
 - des fermentations sucrées : glucose, esculine, lactose, saccharose, mannitol...,
 - de la production d'acides caproïque, butyrique, isovalérique, propionique...,
 - des lipides et phospholipides,
- permet de faire le diagnostic de l'espèce (Tableau I).

TABLEAU 1
CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPALES ESPÈCES DE *CLOSTRIDIUM*

GROUPE	I			II	III				IV
	<i>C. botulinum</i> A. B. F	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. oedematiens</i> (novyi)	<i>C. septicum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. tetani</i>
Mobilité	+	+	+	+	+	+	-	d	d
Production H_2	+	+	+	faible	+	+	+	+	+
Lécithinase	d	-	-	-	+	-	+	-	-
Upase	+	+	-	-	d	-	-	-	-
Uréase	-	-	+	-	d	-	-	-	d
Indole	-	-	+	-	d	-	-	-	d
Géladnase	+	+	+	+	+	+	+	d	+
Digestion lait	d	+	+	+	d	-	+	-	-
Hémolysines	+	+	+	+	+	+	++	-	+
Fermentation:									
Glucose	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Maltose	+	-	+	-	+	+	+	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Saccharose	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Salicine	-	-	-	-	-	d	d	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Toxines	‡	-	+	+	‡ AB	+	+	+	+

* Une neutralisation par un sérum spécifique est indispensable pour l'identification
d : variable selon les types et les souches

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

Le pouvoir pathogène est lié à des toxines et/ou à des activités enzymatiques. Schématiquement les principaux aspects sont regroupés ci-dessous.

TABLEAU CLINIQUE

Tétanos
Botulisme
Intoxication alimentaire
Entérite nécrosante
Colite pseudo-membraneuse
Gangrène gazeuse

ESPÈCE IMPLIQUÉE

C. tetani
C. botulinum
C. perfringens
C. perfringens
C. difficile
C. perfringens, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*.

En milieu hospitalier les *Clostridium* représentent un peu plus de 10 % de tous les isolats de bactéries anaérobies (Tableau II).

TABLEAU n
RÉPARTITION DES SOUCHES DE BACTÉRIES ANAÉROBES
D'APRÈS QUELQUES ENQUÊTES RÉALISÉES EN FRANCE ET AUX U.S.A.

	FRANCE					U.S.A.
Auteur Lieu Année Total des souches	Beerens Lille 1965 474	Sirof France 1976 852	Sedallian Annecy 1973-1978 826	Monteil Strasbourg 1976-1980 1998	Denis Limoges 1980-1984 2409	Allen Indiana 1975-1978 5058
BACILLES						
Gram - : <i>Bfragilis</i>	17%	35%	27%	10%	9%	23%
<i>Pmelaninogenica</i>		H 6%	12%	-1 13%	12%	8%
Autres			3%		20%	
<i>Fusobacteriwn</i>	15%		4%	5%	5%	2%
Gram + • <i>Clostridiwn</i>	8%	37%	14%	13%	13%	11%
<i>Eubacterium</i>	8%		4%	6%	6%	4%
<i>Propionibacterwm</i>	4%	I 6%	7%	6%	9%	17%
Autres sans spores	4%		2%	2%	2%	2%
COCCI						
Gram - : <i>Veillonella</i>	3%	2%	1%	16%*	2%	2%
Gram + : <i>Peppococcus</i>				11%	12%	17%
<i>Peptostreptococcus</i>	J 37%	11%	125%	16%	6%	4%

* Le pourcentage élevé de *Veillonella* est lié à une étude systématique des flores trachéales

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Cette bactérie est responsable d'une neuro-intoxication, le botulisme. Le plus souvent la maladie est consécutive à l'ingestion de toxine préformée dans un aliment contaminé par cette espèce. Cette maladie cosmopolite est redoutable.

HISTORIQUE

Le terme de botulisme est lié au fait que les premiers cas cliniques décrits étaient consécutifs à l'ingestion de saucisse (du latin *botulus*).

En 1895 Van Ermengen décrit le germe et la maladie. Différents sérotypes ont été décrits depuis cette date, Gimenez et Ciccarelli ont montré que certaines souches pouvaient produire deux toxines.

I - CLASSIFICATION

C. botulinum regroupe différentes espèces produisant une neurotoxine qui est responsable d'un même syndrome clinique : le botulisme.

Les souches de *C. botulinum* ont un CG% compris entre 26 et 28 %, contre 22 à 55 % pour l'ensemble des Clostridium.

La nomenclature habituelle distingue quatre groupes de *C. botulinum* :

- Groupe I. Souches protéolytiques. Types toxiques A, B, F
- Groupe II. Toxine de type E et souches non protéolytiques de type B et F.
- Groupe III. Toxines de type C et D, le plus souvent aviaires.
- Groupe IV. Toxine de type G ; le nom de *C. argentinense* a été proposé à la place de *C. botulinum* pour désigner ces souches.

La situation est compliquée par le fait que d'autres *Clostridium* : *C. baratii* et *C. butyricum* sont capables de produire de la toxine botulinique (Tableau I).

II - HABITAT - TRANSMISSION

C. botulinum est un **germe tellurique** très répandu dans la nature, mais la maladie est rare, car l'ingestion de la bactérie ne produit en général pas d'effets.

La bactérie existe sous forme de spores dans la terre, la boue et l'eau. Les végétaux sont contaminés par la spore (fruits, légumes, fourrages). La spore est présente dans l'intestin de nombreux animaux : équidés, moutons, et porcs. Les poissons se contaminent au contact de la boue.

Pour qu'il y ait maladie, il faut qu'il y ait ingestion d'une quantité suffisante de toxine. Cette toxine n'est produite que si la spore survit dans l'aliment pour donner une forme végétative productrice de toxine.

La contamination de la viande peut survenir de deux manières :

- à l'abattage en période de digestion : la bactériémie post-prandiale entraîne une diffusion dans les muscles,
- du fait d'une souillure par le contenu intestinal,

La persistance des spores est favorisée par :

- une mauvaise conservation de l'aliment (fumage et saumurage défectueux),
- une stérilisation insuffisante (température inférieure à 100°C).

La transformation de la spore en forme végétative devient possible dans plusieurs conditions :



- salure insuffisante (NaCl inférieur à 10 %, acide acétique inférieur à 2 %),
- température proche de la température ambiante permettant la multiplication de la bactérie,
- anaérobiose réalisée dans des aliments, au contact de l'os pour les jambons, sous la couche de graisse (pâtés), ou du fait d'emballages étanches,
- présence de glucides (conserves de fruits et légumes).

La production de la toxine dans l'aliment demande un certain délai, en moyenne huit jours à 26°C. La libération serait favorisée par des associations microbiennes qui lysent *C. botulinum*.

La toxine étant thermolabile, l'aliment est dangereux quand il est ingéré cru.

Exceptionnellement le botulisme peut se développer par production de toxine au niveau d'une plaie infectée ou au niveau de l'intestin.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

On distingue deux formes de botulisme : l'intoxication et la toxi-infection. Chez certains nourrissons *C. botulinum* s'implante dans l'intestin et libère la toxine synthétisée *in situ*.

Toxine et bactérie ingérées passent sans dommage la barrière gastrique. La toxine retrouvée dans l'intestin correspond à la toxine ingérée et à la toxine libérée lors de la lyse bactérienne, cette toxine résiste donc à l'acidité gastrique et aux sucs digestifs. Une fois dans l'intestin elle passe dans les lymphatiques puis dans le sang et va se fixer sur le tissu nerveux. L'intoxication se traduit par une paralysie générale (de type flasque) de l'activité neuromusculaire et du système nerveux autonome.

L'action de la toxine s'exerce surtout sur le système nerveux périphérique, à la différence de la toxine tétanique qui agit surtout sur le système nerveux central.

Chez l'homme, il y a une diminution de l'activité :

- du nerf vague,
- des nerfs de contraction vésicale, des organes sécrétoires, oculomoteurs,
- des motoneurones.

Mode d'action :

La toxine empêche la transmission cholinergique dont le médiateur est l'acétylcholine et agit surtout sur les terminaisons nerveuses

- des fibres nerveuses préganglionnaires parasymphatiques, sympathiques **et du** système nerveux autonome,
- des fibres du système nerveux parasymphatique,
- des fibres des motoneurones innervant les muscles striés.

Mécanisme :

L'acétylcholine agit de la manière indiquée sur la figure 1 au niveau de la plaque neuromusculaire.

La toxine inhibe la libération de l'acétylcholine, en empêchant l'activation **du** mécanisme de libération par les ions Ca^{2+} .

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

A - Pour l'animal

Les bovins contractent la maladie par ingestion de fourrages moisissés, contaminés par des cadavres de rongeurs (botulisme A, B, D).

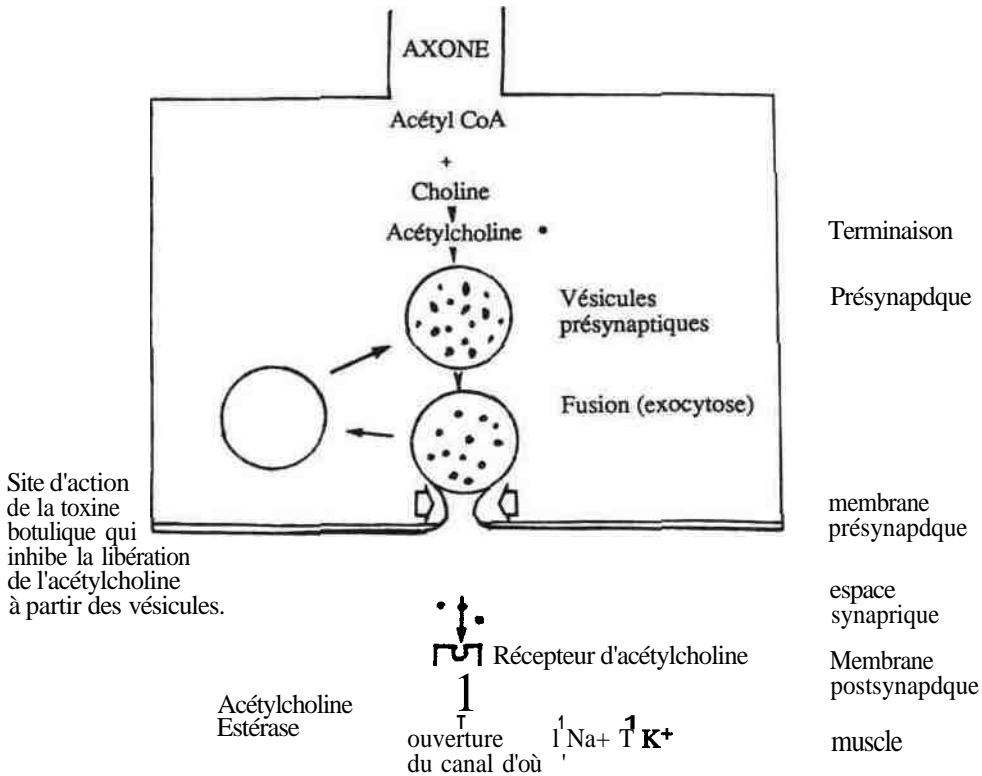


FIGURE 1
SITE ET MODE D'ACTION DE LA TOXINE BOTULIQUE
AU NIVEAU DE LA PLAQUE NEUROMUSCULAIRE

Les ovins peuvent aussi être touchés. Le botulisme équin peut décimer des écuries entières (botulisme B). Le botulisme aviaire (botulisme C) provoque des paralysies flasques des muscles du cou.

Expérimentalement si le cobaye est l'animal de choix, les souris sont très sensibles également à la toxine, comme le singe, le chat et le lapin.

B - Pour l'homme

Il s'agit souvent de petites épidémies familiales ou touchant les convives d'un même repas.

1. C'est essentiellement une « intoxication » liée à l'ingestion de toxine préformée

Les aliments impliqués sont classiquement :

- les conserves familiales, artisanales insuffisamment stérilisées, les viandes surtout de porc : jambons fumés, confits, foie gras (botulisme B)
- les fruits et légumes souillés par de la terre, notamment aux U.S.A. (botulisme A)
- les poissons de mer ou de rivière : conserves, poissons crus ou fumés responsables de botulisme E et F (U.R.S.S., Canada, Japon...).

Après ingestion de l'aliment contaminé on distingue :

- **La période d'incubation** qui peut être de 8 à 12 heures en cas de botulisme suraigu, mais qui peut atteindre 2 à 3 semaines.

- **La période d'invasion** retrouvée dans la moitié des cas, comportant des signes digestifs non spécifiques (nausées, vomissements, diarrhée).
- **La phase d'état** caractérisée dans les formes typiques par

al Des troubles moteurs :

- oculaires : avec comme premier signe la paralysie de l'accommodation avec vision floue de près, suivie de mydriase, puis d'atteintes extrinsèques (ptosis, strabisme, diplopie),
- buccopharyngé : avec dysphagie douloureuse pouvant entraîner des fausses routes,
- œsophagiens, coliques, vésicaux..., d'autres paralysies peuvent toucher les muscles du dos, de la nuque, des membres voire le diaphragme.

bl Des troubles sécrétoires :

Avec tarissement des sécrétions lacrymales, salivaires, de l'ensemble du tractus digestif, sudoral, lacté. L'assèchement des muqueuses favorise les surinfections.

cl Des signes négatifs :

Pas de fièvre, pas d'atteinte cardiovasculaire, pas de troubles de la conscience ; et de plus les paramètres biologiques du LCR sont dans la limite de la normale.

- **L'évolution** est le plus souvent favorable en France (4 % de décès), plus grave aux États Unis (50-60 % de décès). Les formes mortelles se retrouvent souvent parmi les formes à incubation courte et avec certains sérotypes (types A et E). Le pronostic varie également avec la quantité d'aliments ingérée et avec le degré d'hydratation des aliments. Les aliments très hydratés contiennent plus de **toxine**.

2. C'est plus rarement une « toxi-infection »

Le germe est alors isolé chez le malade lui-même au niveau de plaies souillées avec gangrène ou au niveau des sites d'injections parentérales (plus de 40 cas aux USA).

Récemment des cas de mort subite du nourrisson ont été attribués à *C. botulinum*. Le germe ingéré, par exemple avec des aliments lactés contenant du miel, s'implante dans l'intestin et y sécrète sa toxine. Il y a toxinogénèse endogène, puis apparition de constipation, de troubles respiratoires et de décès (enfants vers la 12^e semaine). Cette étiologie a été retrouvée dans 4,7 % des 21 cas de mort subite, rapportés par Amon et seraient dus à des types toxiques rares (C, F et G) dont le pouvoir pathogène chez l'homme n'est pas toujours bien documenté. On ne sait pas très bien pourquoi le germe peut s'implanter dans la flore intestinale de l'enfant de moins de 1 an, mais il faut noter que dans un certain nombre de cas exceptionnels chez l'adulte cette colonisation peut exister.

Chez certains animaux **cette implantation ne peut se faire que durant une période très courte de la vie.**

LE BOTULISME EN CHIFFRES
En France entre 1936 et 1939:15 cas entre 1939 et 1945 : 1000 cas entre 1971 et 1978: 454 cas actuellement près de 60 cas/an
Mortalité : en France : 4 % aux USA : 50-60 %

TABLEAU 1
ÉPIDÉMIOLOGIE SUIVANT LE SÉROTYPE DE *CLOSTRIDIUM BOTUUNUM*

Sérotype	Hôte le plus habituel	Aliment responsable	Répartition géographique	Mortalité
A	bovin, ovin rongeur volaille (oie)	légumes : haricots, petits pois viande	États-Unis	35% à 60%
B	intestin du porc (pas de maladie) bétail, volaille,	jambon, lard salé confit d'oie conserves de petits pois	France +++ Europe continentale États-Unis	3% environ 10 % environ 50 %
C	oiseaux	pâté de campagne	rare(Afrique, Amérique)	35%
D	rat, chat (pas de maladie), cheval, bovin, porc	jambon (Tchad)	affection exceptionnelle (Afrique, Australie)	
E	poisson	poisson (en saumure, fumé) laushi (condiment à base de poisson fermenté) légumes (conserves familiales)	U.R.S.S. (pourtour de la Baltique) Japon Canada États-Unis	30% à 40%
F	poisson	crabe, poisson mer et rivière	rare (Danemark)	
G			(Argentine)	jamais chez l'homme

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Forme végétative

1. Morphologie

C. botulinum est un bacille à Gram positif (faible) aux extrémités arrondies de 4-8 μm sur 0,9-1,2 μm . Il est mobile (6 à 20 cils péritriches). Il n'est pas capsulé.

Dans les cultures jeunes, on peut observer de courtes chaînettes. A l'inverse dans les cultures âgées, on observe des formes d'involution vacuolaires et des spores.

2. Cultures

— C'est un germe anaérobie strict pour lequel les meilleures conditions de croissance sont une température de 26 à 28°C et un pH alcalin (8 à 8,4).

— Aspect des colonies :

- en gélose profonde VF ou VL additionnée de sang, de jaune d'œuf, elles sont lenticulaires, les parois sont lisses, parfois épineuses en oursin (Figure 2).
- en surface les colonies sont circulaires et jaunâtres.



FIGUREZ
ASPECT DES COLONIES DE *C. BOTULINUM* EN MILIEU SEMI-SOLIDE
(COLONIES LISSES ET ÉPINEUSES)

3. Caractères biochimiques (Tableau II)

La principale source énergétique est glucidique : glucose, maltose, lévulose... en libérant des acides acétique, butyrique (odeur de beurre rance caractéristique), et en plus faible quantité acide lactique. Les souches de type D sont plus glucidolytiques ; les souches de type C le sont moins.

Action protéolytique : protéolyse plus ou moins marquée selon les types. A et B sont gélatine (+), décarboxylase (+), désaminase (+)..., C, D et E sont peu protéolytiques. Le type B produit une hémolysine.

Pouvoir lipolytique très marqué pour *C. botulinum* A, B et F.

Pouvoir réducteur élevé pour A, faible pour B, C, E.

TABLEAU n
CARACTÉRISTIQUES DES ESPÈCES DE *CLOSTRIDIUM*
PRODUCTRICES DE NEUROTOXINE

Groupes	Types de toxines	Production Lécithinase	Production Lipase	Fermentation > sucres	Hydrolyse gélatine	Métabolites volatils*
I. <i>C. botulinum</i>	A,B,F	-	+	+	+	A,B,iB,iV
II. <i>C. botulinum</i>	B,E,F	-	+	+	+	A,B
III. <i>C. botulinum</i>	C,D	+	+	+	+	A,B,P
IV. <i>C. argentinense</i>	G	-	-	-	+	A3,iB,iV
Divers						
<i>C. baratii</i>	F	+	-	+	-	A3
<i>C. butyricum</i>	E	~	~	+	"	A3

* déterminés en chromatographie gaz-liquide

A. Ac. acétique, B. Ac. butyrique, iB. Ac. isobutyrique, P. Ac. propionique, iV. Ac. isovalérique

4. Vitalité réduite

Bactérie végétative détruite en 30 minutes à 60°C ou en 2 minutes à 80°C, mais dans ces conditions la sporulation est rapide.

B - Spore

La sporulation est favorisée par les conditions de vie difficiles et par l'arginine.

La spore est ovoïde, déformante, subterminale.

La spore est très thermorésistante, ainsi en 8 minutes à 115°C on tue 95 % des spores, les 5 % restantes résistent 5-10 minutes à 120°C.

La thermorésistance est variable selon les sérotypes, diminuant dans l'ordre suivant C, A, B, D, E ; elle est favorisée par une faible salure (1 à 6 %) ou les lipides.

La spore résiste aux antiseptiques : il faut 24 heures pour détruire les spores avec du formol à 20 %.

C. botulinum sérotype A est l'une des bactéries les plus radiorésistantes.

Les spores de *C. botulinum* sont également assez résistantes à divers agents bactéricides : U.V., hypochlorite, alcool, ammoniums quaternaires.

La germination est inhibée par le NaCl (10 à 15 %), certains acides gras **et des** substances antibiotiques produites par certaines bactéries, tel *B. subtilis*.

C - Toxine

1. Production

- Elle est sécrétée par la bactérie en phase exponentielle de croissance ; elle est en partie endocellulaire et passe secondairement dans le milieu extérieur lors de la lyse des bactéries.
 - Elle est parfois sécrétée sous forme inactive : protoxines A et E, et activée par des enzymes protéolytiques de la bactérie.
 - Les milieux utilisés pour obtenir une bonne synthèse de la toxine sont à base d'hydrolysats de caséine ou de bouillon VF glucose à 5 %. La température optimale de synthèse est comprise entre 30 et 37°C, elle est inhibée en dessous de 10°C, mais pas par une température « ambiante » de 25°C.
 - L'optimum de production dans les cultures se situe vers le 6^e jour.
 - La synthèse de la toxine, au moins pour les types C et D, est sous la dépendance de phages lysogènes, les souches non lysogènes n'étant pas virulentes.
- De même la présence de plasmides a été corrélée notamment avec la production de la toxine G.

2. Propriétés

La toxine est de nature protéique, le poids moléculaire est élevé (Tableau III) allant de 141 kDa à 170 kDa. On distingue une chaîne lourde (100 kDa) et une chaîne légère (50 kDa) liées par un pont disulfure. La toxine est initialement synthétisée sous la forme d'une seule chaîne qui est ensuite scindée par une enzyme protéolytique d'origine endogène ou exogène. Au sein du type C on distingue une neurotoxine majeure dite C₁ et une seconde toxine mineure C₂ différente ayant une action sur la perméabilité vasculaire et une action létale. Pendant longtemps on a pensé que les PM étaient beaucoup plus élevés allant jusqu'à 900 kDa, mais les toxines existent sous forme de polymères. La toxine a pu être obtenue sous forme cristallisée. Les toxines sont riches en asparagine et en glutamine.

TABLEAU m
POIDS MOLÉCULAIRES DES TOXINES BOTULIQUES (D'APRÈS SEBALD).

Type immunologique	Poids moléculaire		
	toxine	sous-unités	
		chaîne lourde	chaîne légère
A	145000	97000	53000
B	167000	104000	59000
C ₁	141000	98000	53000
C ₂		105 000*	50 000*
D	nd	nd	nd
E	147000	102000	50000
F	155000	105000	56000

* toxines différentes

nd. non déterminé

3. Toxicité

C'est la substance la plus active parmi les produits biologiques connus : 1 mg de toxine A cristallisée représente 31 millions de DMM souris et 1,2 millions de DMM kg cobaye. La toxicité dépend :

- de la voie d'administration. La voie orale est la moins efficace. Sous forme déshydratée, le simple contact de la toxine avec la conjonctive a provoqué le décès d'un chercheur,
- de l'animal, souris et cobaye sont très sensibles.

Le dosage de la toxine s'effectue par étude du pouvoir pathogène pour **la** souris (DMM, DL 50), par hémagglutination passive, par précipitation (floculation initiale de Ramon)... *Les toxines sont antigéniques, transformables en anatoxine par le formol et la chaleur.*

4. Stabilité

Les toxines sont :

- thermolabiles détruites à 80°C en 15 minutes, en 10 minutes à 100°C, les toxines C et D sont les plus thermorésistantes ;
- sensibles aux oxydants (eau de Javel), à la lumière ;
- stables à pH 3, et résistent donc à l'acidité gastrique chez l'homme ; les vautours posséderaient des enzymes digestives détruisant la toxine contenue dans les cadavres.

5. Sérotypes

On connaît actuellement 7 sérotypes désignés par les lettres A à G. La répartition des sérotypes, l'habitat, la zone géographique de chaque sérotype, ainsi que la mortalité qui leur incombe figurent dans le tableau I. Le type B est presque toujours en cause en France.

6. Usage thérapeutique

La neurotoxine de type A est utilisée dans le traitement de troubles neuromusculaires (dystonie spastique et torticolis spasmodique) et ophtalmologiques (strabisme, blépharospasme).

D - Autres antigènes

En dehors des toxines, il existe des facteurs hémolytiques, hémagglutinants, qui ne paraissent pas liés à la toxine. On reconnaît aussi des antigènes somatiques thermostables et des antigènes flagellaires thermolabiles. On a reconnu 3 sous-types H pour les souches A et 4 pour les souches B.

VI - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU BOTULISME

A - Recherche de la toxine dans le sérum du malade

Cet examen a un grand intérêt. Il permet le diagnostic des formes frustes ou à porte d'entrée non digestive. La toxinémie apparaît vers le 2^e jour de la maladie et persiste 2 à 3 semaines. Cet examen doit être pratiqué avant administration éventuelle au malade de sérum antitobotulinique ou de médicaments neurotropes. Il nécessite environ 20 ml de sang.

La toxémie est recherchée par inoculation par voie intra-péritonéale du sérum du patient à la souris, en utilisant des animaux protégés par les divers antisérums et des animaux non protégés.

Dans des cas exceptionnels, la recherche de la toxine peut se faire dans les selles ou les produits de vomissements du malade, une aspiration gastrique, voire dans le sérum ou les viscères post-mortem.

B – Recherche de la toxine dans l'aliment suspect

Il est indispensable lors d'une suspicion d'un botulisme de retrouver les aliments suspects et de les adresser en même temps que le patient à l'établissement hospitalier.

1. Mise en évidence de la toxine

Elle se fait par la recherche du pouvoir pathogène sur animal et épreuve de l'animal protégé.

- on prélève la zone suspecte de l'aliment, par exemple pour les jambons la moelle osseuse, la zone située près de l'os là où la chair a un aspect rosé ;
- on broie les tissus prélevés dans du sérum physiologique ou un tampon, on broie le tout en maintenant une température basse, on centrifuge à basse vitesse pour éliminer les grosses particules, on pourra rechercher le germe sur le culot, la toxine sera recherchée sur le surnageant ;
- pour la recherche et le titrage de la toxine, on inocule des souris avec des volumes croissants de surnageant par voie intra-péritonéale : 0,1 - 0,25 - 0,5 - 1 ml (5 souris par dose). On utilise parfois à l'aveugle, pour un premier screening 0,25 ml par souris mais le titrage sera important pour réussir ultérieurement la neutralisation ;
- l'épreuve de séro-neutralisation permettra de vérifier que c'est bien de la toxine botulique qui a tué l'animal non protégé, mais aussi de déterminer le sérotype en cause. Pour cela on met en présence un certain volume de surnageant (2 à 10 DMM) et du sérum anti A, le même volume de surnageant et du sérum anti B, etc. Après avoir laissé en contact durant 30 minutes à 37°C, on injecte chaque mélange à plusieurs animaux par voie intrapéritonéale (Schéma).

La présence de toxine est révélée par le décès des animaux en 24 ou 48 heures dans un tableau de paralysie flasque. Le type toxinique sera reconnu par la neutralisation de ce pouvoir pathogène à l'aide de l'antisérum spécifique.

Cette mise en évidence de la toxine se heurte cependant à un certain nombre de difficultés qu'il ne faut pas négliger : la mort de l'animal peut ne pas être due à une action toxinique. En effet, la présence de métaux lourds, d'autres toxiques ou l'hyperosmolarité créée lors de l'inoculation peuvent amener des erreurs de diagnostic.

Aliment

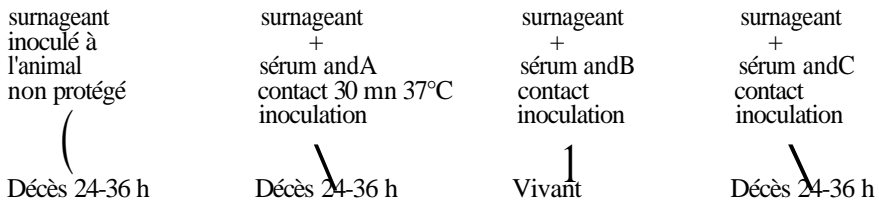
Prélèvement zone suspecte
(pies de l'os pour jambon)

broyer

ajouter sérum physiologique
laisser en contact 20 minutes
centrifuger à basse vitesse

la toxine est dans le surnageant pour l'épreuve de séroprotection partir de 2 à 10 DMm

Utiliser pour chaque essai 5 souris ou 1 cobaye

**SCHÉMA**

DU TYPAGE DE LA TOXINE PAR EPREUVE DE L'ANIMAL PROTÉGÉ

(Exemple toxine type B)

2. Isolement du germe

Pour la culture, on part soit du culot, soit du surnageant si la centrifugation a été peu rapide. On traite alors l'extrait par la chaleur durant 30 minutes à 75°C ou 10 minutes à 100°C pour sélectionner les spores. On ensemence ensuite un milieu VF glucose, qui est placé à 33°C durant 7 à 8 jours. On recherche alors la production de toxine sur la culture par inoculation à l'animal. On pourra procéder à un isolement de la souche et ensemencer une galerie d'identification.

Une recherche du germe pourrait aussi se faire directement sur l'aliment en immuno-fluorescence avec des sérums *anti-C.botulinum* ; mais la spécificité de cette technique est discutable notamment entre sérotypes et aussi entre espèces. De fausses réactions ont été notées notamment avec *C. sporogenes*.

Récemment une méthode ELISA a été décrite pour détecter les toxines A et B dans les aliments grâce à des anticorps monoclonaux.

VII - TRAITEMENT**A - Le traitement prophylactique**

Il concerne les aliments.

J. Préparation

- Les aliments destinés aux conserves doivent être soigneusement lavés pour les débarrasser de la terre (fruits, légumes...) ;
- Les animaux servant à la préparation de jambon par exemple, doivent être laissés à jeun et au repos au moins 24 heures avant l'abattage, ;
- Les poissons destinés à la consommation ou aux conserves doivent être éviscérés.

2. Conservation

- La stérilisation doit être suffisante pour les conserves (120°C à l'autoclave),
- La salaison, l'emploi d'acide acétique, l'acide ascorbique et le nitrite de Na peuvent éviter l'anaérobiose,
- Les emballages sous cellophane favorisent l'anaérobiose,
- La congélation ne détruit pas la toxine, mais empêche sa formation.

3. Consommation

- Éviter tout aliment suspect (odeur butyrique, rance), viande avec aspect suspect, boîtes de conserves bombées, ou sous pression lors de l'ouverture (jet),
- La cuisson détruit la plupart des toxines, ce qui ne saurait justifier l'ingestion d'un aliment suspect même chauffé.

B - Le traitement curatif

1. Il est avant tout symptomatique

Hospitalisation dans un service de réanimation, pour prévenir l'arrêt respiratoire (intubation trachéale, respiration assistée), et les infections provenant des muqueuses altérées par l'absence de sécrétions (désinfection).

2. Les traitements spécifiques ou reposant sur des bases physiopathologiques ont une efficacité plus discutable

- La sérothérapie spécifique polyvalente avant sérotypage de la toxine, puis monovalente, a une action neutralisante sur la toxine circulante (en l'absence de traitement, la toxine sérique peut persister plusieurs semaines), mais elle ne mobilise pas la toxine fixée sur les centres nerveux. Il faut en outre éviter la maladie sérique (corticoïdes),
- L'anatoxinothérapie peut rendre service en raison de l'évolution prolongée de la maladie.
- Le chlorure de guanidine réduirait les manifestations neurologiques du botulisme,
- Le monoacétate de guanine a aussi été essayé.

En fait un consensus semble se faire pour reconnaître que ces traitements n'influencent pas significativement l'évolution du botulisme.

BIBLIOGRAPHIE

- ARNON S.S., « Infant botulism » in : *Anaerobic infections in Human*. S.M. Finegold and W.L. George. Ed. Académie Press. San Diego, 1989, 601-609.
- HATHENAY C.L., « Toxigenic Clostridia » . *Clin Microbiol. Rev.*, 1990, 3, 66-98.
- KENNEDY R.H., BARTLEY G.B., FLANAGAN J.C., WALLER R.R., « Treatment of blepharospasm with botulinum toxin ». *Mayo Clin. Proc.*, 1989, **64**, 1085-1090.
- SEBALD M., « État actuel du botulisme humain et animal en France. » *Bull. Ass. Ane. Élèves Inst. Pasteur*, 1984, **101**, 35-39.
- SEBALD M. « *Clostridium* » in : *Bactériologie Médicale.*, Ed. L. Le Minor et M. Véron, Flammarion, Paris, 1990, 887-931.
- SEBALD M., JOUGLARD J., « Aspects actuels du botulisme ». *Rev. Prat.*, 1977, **27**, 173-180.

CLOSTRIDIUM DIFFICILE

Clostridium difficile est l'agent étiologique des colites pseudo-membraneuses (CPM) ; il est également responsable de nombreux cas de diarrhées ou de colites consécutifs à une antibiothérapie. Ces pathologies sont dues à la production et à l'action de deux toxines dans le côlon : une entérotoxine et une cytotoxine.

HISTORIQUE

C. difficile a été isolé en 1935 par Hall et O'Toole à partir de selles de nouveau-nés. En 1971 George et Symonds ont montré la présence dans l'intestin, au cours des colites pseudo-membraneuses, d'une toxine neutralisée par un sérum anti-*Clostridium sordellii*.

Bartiett et coll. en 1978 isolent *C. difficile* dans cette pathologie et font le lien entre cette espèce et la toxine produite. En 1981, cette même équipe, ainsi que celle de Wilkins, montre que certaines souches de *C. difficile* sécrètent deux toxines : une cytotoxine (ou toxine B) et une entérotoxine (ou toxine A).

I - CLASSIFICATION

C. difficile appartient au groupe III des *Clostridium*.

C. difficile a un GC % de 28, voisin de celui des principales espèces de *Clostridium*.

II - HABITAT

L'intestin de l'homme ainsi que celui de nombreuses espèces animales peut héberger *C. difficile*. Chez l'homme, le taux de colonisation varie selon l'âge : 20 à 70 % des enfants sains de moins de 1 an, seulement 3 % des adultes sains. Mais chez ces derniers, la fréquence du portage peut être influencé par divers facteurs : antibiothérapie, pathologie digestive, hospitalisation. Dans les selles des malades, *C. difficile* peut être présent en nombre élevé : 10^6 à 10^8 /gramme de selles.

C. difficile est capable de survivre plusieurs mois dans l'environnement grâce à ses spores qui résistent aux désinfectants.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Les diarrhées, les colites et les colites pseudo-membraneuses associées à *C. difficile* sont des affections qui s'observent généralement en milieu hospitalier.

La survenue de diarrhées ou de colites chez un adulte fait suite :

- à une contamination exogène par *C. difficile*
- à un déséquilibre de la flore intestinale par une antibiothérapie.

Tous les antibiotiques donnés *per os* ou par voie parentérale peuvent induire cette affection, plus particulièrement ceux incomplètement résorbés par voie orale et/ou ayant un cycle entéro-hépatique. Les antibiotiques les plus fréquemment mis en cause sont les aminopénicillines, les céphalosporines et la clindamycine.

Il ne s'agit pas d'une surinfection ; *C. difficile* reste, dans la majorité des cas, sensible *in vitro* à l'antibiotique responsable. *C. difficile* sporulerait dans le côlon avec régénération de la forme végétative quand le taux d'antibiotique dans la lumière colique est relativement bas. La flore intestinale du côlon, exerçant son effet de barrière, inhibe normalement la croissance de *C. difficile*, et ce n'est qu'à la faveur

d'un déséquilibre, au décours d'une antibiothérapie, que *C. difficile* se multiplie et produit ses toxines.

L'observation de CPM lors de l'utilisation de certains anticancéreux (methotrexate, 5 fluoro-uracile...) est possible (atteinte de la flore ou toxicité digestive ?).

Malgré la présence de *C. difficile* dans leur flore intestinale, les enfants de moins de 2 ans n'ont jamais de CPM, sauf circonstances favorisantes. Chez les nourrissons des souches non toxigènes sont surtout isolées.

Les deux toxines produites par *C. difficile* provoquent une lésion inflammatoire de la paroi colique. Lorsque les lésions et l'inflammation ne sont pas trop sévères, le seul symptôme observé est la diarrhée. Si les lésions sont plus étendues, une biopsie du côlon met en évidence une muqueuse congestive recouverte par une pseudo-membrane, c'est à dire de plaques isolées ou confluentes de couleur crème ou jaune-verte ; elles sont constituées d'une couche de fibrine et de mucine incluant des leucocytes.

Pour des raisons inconnues, ces toxines n'ont aucun effet sur la muqueuse colique des jeunes enfants, ainsi que sur celle des patients atteints de mucoviscidose (absence de récepteurs sur les entérocytes ?).

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

C. difficile provoque diverses pathologies intestinales allant du portage asymptomatique à la colite pseudo-membraneuse.

Les troubles digestifs apparaissent en moyenne moins d'une semaine après le début du traitement, voire 4 ou 6 semaines après son arrêt.

Il serait responsable de 15 à 25 % des diarrhées associées à une antibiothérapie. Les formes cliniques sont diverses : diarrhées banales ou diarrhées sévères, associées ou non à une colite.

La CPM est évoquée devant les symptômes suivants : selles liquides, muqueuses, abondantes, coliques abdominales, fièvre, hyperleucocytose, hypocholestérolémie. Le diagnostic clinique de colite pseudo-membraneuse est évoqué lors d'une observation endoscopique de pseudo-membranes sur la paroi colique.

La CPM peut évoluer vers des complications rares, mais sévères : des mégacôlons toxiques, des perforations, des péritonites. Les manifestations extra-digestives sont inhabituelles.

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Caractères morphologiques

C. difficile est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, donnant des spores ovales subterminales déformantes. La majorité des bactéries isolées de produits pathologiques sont mobiles grâce à une ciliature péritriche.

Chez quelques souches, des fimbriae ou une capsule ont été mis en évidence, mais leur rôle dans la pathogénicité reste discuté. Leurs propriétés d'adhésion restent à confirmer.

B - Caractères culturels

L'incubation de toute culture se fait à 37°C en atmosphère anaérobie.

Dans un bouillon constitué de peptones, d'extraits de levure et de glucose (bouillon PGY ou TGY), un trouble homogène est obtenu en 24 h avec un sédiment abondant.

Sur gélose au sang, les colonies sont circulaires, plates ou légèrement bombées, opaques, grisâtres, ou blanchâtres, sans zone d'hémolyse.

La sporulation est obtenue en culture après plus de 48 heures et elle est favorisée par la présence de taurocholate de sodium à 0,1 %.

C - Caractères biochimiques

- Métabolisme protéique : pas de digestion du lait, hydrolyse de la gélatine
- Absence de nitrate réductase et d'uréase.
- Métabolisme glucidique : fermentation du glucose, du fructose, du mannitol et du mannose, hydrolyse de l'esculine.
En bouillon PGY, production des acides gras volatils suivants : acide acétique, isobutyrique, butyrique, isovalérique, valérique, isocaproïque, formique, lactique.
- Métabolisme lipidique : pas de lipase, pas de phospholipase C.

D - Toxines

C. difficile produit deux toxines :

- la toxine A (308 kDa) appelée entérotoxine est environ 1 000 fois moins cytopathogène sur les cultures cellulaires que la toxine B, cette toxine donne un test positif dans l'anse iléale de lapin, elle donne une nécrose hémorragique sévère et une sécrétion liquidienne ;
- la toxine B ou cytotoxine (270 kDa) provoque un arrondissement cellulaire sur les cellules en culture, un test de l'anse iléale négatif mais une ulcération hémorragique du caecum de hamster.

L'effet cytotoxique sur les cellules semble identique pour les deux toxines avec une désorganisation et une condensation des filaments d'actine du cytosquelette, suggérant un mécanisme d'action commun. Une fixation sur des récepteurs différents expliquerait la diversité des effets. La destruction de la bordure en brosse de l'intestin par la toxine A précéderait l'action de la toxine B.

La production des 2 toxines n'est pas liée à la sporulation et semble être co-régulée, les 2 gènes correspondants qui ont été clonés, sont contigus sur le chromosome bactérien et possèdent le même promoteur.

VI - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

Il repose sur l'isolement de *C. difficile* dans les selles et la mise en évidence d'une activité toxique de la souche ou du filtrat de selles.

A - Prélèvement

Les selles doivent être fraîchement émises ou conservées à -20°C.

B - Culture

Les selles sont diluées ou ensemencées directement sur milieu CCFA (ce milieu est le milieu sélectif et spécifique de George à base de céfoxitine, cyclosérine, de fructose

et d'agar). Les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37°C durant 24 à 48 heures. Les colonies fermentent le fructose et donnent une coloration jaune, elles ont un aspect typique, avec margination filamenteuse irrégulière.

L'identification fait appel aux caractères biochimiques décrits ci-dessus. Certaines galeries commercialisées peuvent aider le diagnostic (API An-ident System, APIZYM Micro-system, Rapid ID ANA System...).

Le diagnostic peut être complété par une étude des produits de fermentation du glucose analysés en chromatographie en phase gazeuse (le pic d'acide isocaproïque est caractéristique).

Des marqueurs épidémiologiques ont été proposés (phénotypes de résistance aux antibiotiques, sensibilité à des bactériophages ou des bactériocines, analyse des profils protéiques ou d'ADN après digestion par des enzymes de restriction, sérotypie).

C - Recherche des toxines

Les toxines sont recherchées, soit dans le surnageant de culture, soit dans les surnageants centrifugés de selles après une filtration stérilisante.

Test de cytotoxicité en culture cellulaire (méthode de référence)

La toxine B est mise en évidence grâce à son effet cytotoxique puissant sur beaucoup de lignées cellulaires (Me Coy, Vero, MRC-5...). Les filtrats de selles peuvent avoir un effet toxique non spécifique et l'effet cytotoxique doit être neutralisé par un sérum antitoxine de *C. sordellii* ou anti-toxine B.

Autres méthodes

- Contre-immunoelectrophorèse et agglutination de particules de latex sensibilisées : ces méthodes sont discutées (réactions croisées avec d'autres espèces bactériennes, pas de distinction entre souches toxigènes et non toxigènes)
- Plusieurs méthodes ELISA ont été décrites mais leur utilisation est encore partielle de même, un test rapide "Dot immunobinding assay" (*C. diff*-CUBE, Difco) est proposé.
- L'utilisation de la technique d'amplification génique (PCR) n'en est qu'à son **début**.

VII - TRAITEMENT

Le traitement des diarrhées ou des colites à *C. difficile* débute par l'interruption de l'antibiothérapie et par la correction des troubles hydro-électrolytiques.

Dans les formes sévères de diarrhées et de colites, il faut adjoindre la prise orale de vancomycine ou de métronidazole : antibiotiques dont les concentrations élevées dans les selles inhibent le développement de *C. difficile*. L'ensemble des symptômes disparaît en 5 ou 7 jours.

Il faut noter la fréquence élevée de rechutes dans les semaines qui suivent l'arrêt des troubles digestifs (25 à 50 % selon les études). Des thérapeutiques de relais au traitement ont été proposées : cholestyramine (résine chélatant les 2 toxines) ou prise de *Saccharomyces boulardii* (restaurant l'effet de barrière).

La prophylaxie semble simple en apparence, mais en milieu hospitalier *C. difficile* peut se comporter comme un véritable opportuniste pouvant conduire à des épidémies par contamination entre malades.

BIBLIOGRAPHIE

- BERGOGNE-BEREZIN E. « Microbial Ecology and Intestinal Inféodons », 1989, Springer-Verlag Ed., Paris, 101p..
- BORRIELO S.P., DAVIES H.A., KAMIYA S., « Virulence factors of *Clostridium difficile* » *Rev. Infect. Dis.*, 1990,**12**, n° 2, S185-S191.
- GEORGE W. L., SUTTER V. L., CITRON D., FINEGOLD S. M-, « Sélective and differential médium for isolation of *Clostridium difficile* », *J. Clin. Microbiol.*, 1979, **9**, 214-219.
- LAUGHON B. E., VISCIDI R. P., GDOVIN S. L., YOLKEN R. H., BARTLETT J. G., « Enzyme immuno assays for détection of *C. difficile* toxins A and B in fécal spécimens », *J. Inf. Dis.*, 1984,**149**, 781-788.
- LYERLY D.M. KRIVAN H.C., WILKINS T.D., « *Clostridium difficile* : its disease and toxins », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 1-18.
- NGUYEN V.J., RIHN B., HECKEL C., BISSERET F., GIRARDOT R., MONTEIL H. « Enzyme immunoassay (ELISA) for détection of *Clostridium difficile* toxin B in spécimen of faeces », *J. Med. Microbiol.*, 1990, **31**, 251-257.
- RAMBAUD J.C., DUCLUZEAU R., « *Clostridium difficile* et Pathologie Intestinale », 1990, Springer-Verlag Ed., Paris, 138 p.
- RIHN B., BECK G., MONTEIL H., LECERF F., GIRARDOT R., « Effect of thé cytotoxin of *Clostridium difficile* on cultured hepatoma cells », *Biol. Ce//.*, 1985, 53, 23-32.
- TABAQCHALI S., « Epidemiologic markers of *Clostridium difficile* », *Rev. Infect. Dis.*, 1990,**12**, n°2,S192-S199.
- TYTGAT F., « Fréquence de portage de *Clostridium difficile* dans une population hospitalière et caractéristique des souches isolées », *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 1981,**14**, 163-169.
- WOODS G.L., IWEN P.C., « Comparison of dot immunobinding assay, latex agglutination and cytotoxin assay for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea », *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28, 855-857.
- WREN B., CLAYTON C., TABAQCHALI S., « Rapid identification of toxigenic *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction », *Lancet*, 1990, 335, 423.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Connu comme l'agent des gangrènes gazeuses ou des septicémies du post-partum, *Clostridium perfringens* est isolé actuellement lors d'intoxications alimentaires d'infections tissulaires ou systémiques.

HISTORIQUE

Isolé pour la première fois en 1881, ce germe a vu son rôle dans les gangrènes gazeuses reconnu par Welch, Nuttall et Frankel, puis dans les appendicites aiguës par Veillon.

L'étude des facteurs toxiques et la différenciation des types de *Clostridium* remontent aux années 1950 ; en 1953 Hobbs démontre l'existence d'une entérotoxine.

1 - CLASSIFICATION

Au sein des 4 groupes de *Clostridium*, *C. perfringens* figure dans le groupe III saccharolytique, non ou faiblement protéolytique.

Il se distingue des autres *Clostridium* par son immobilité et par la présence d'une capsule. L'espèce *C. perfringens* est divisée en cinq sous-types toxiques désignés par des lettres de A à E.

Le type A est surtout rencontré en pathologie humaine ; les autres types sont responsables d'entérotoxémies d'origine endogène chez l'animal (ovidés, bovidés), rarement d'infections humaines.

II - HABITAT - TRANSMISSION - PHYSIOPATHOLOGIE

C. perfringens est présent dans la flore intestinale de l'homme et de nombreuses espèces animales. Parmi les espèces de *Clostridium* présentes dans l'intestin, *C. perfringens* arrive par ordre de fréquence en deuxième place derrière *C. ramosum*.

Le sol contient des spores de *C. perfringens*. La présence de cette espèce ou de ses spores dans les eaux ou les aliments est en faveur d'une contamination fécale.

L'homme se contamine :

- soit à partir d'une source endogène (intestin, vagin...) à l'occasion d'une effraction ou d'une intervention chirurgicale,
- soit à partir d'une source exogène à la faveur :
 - d'une plaie, le germe pénètre puis se multiplie dans les tissus où il libère des toxines et des enzymes,
 - de l'ingestion de 10^8 à 10^9 germes dans des aliments contaminés, ce qui peut provoquer une toxi-infection alimentaire (à titre indicatif entre 30 et 80 % des carcasses sont contaminées par *C. perfringens* ; la viande est dite contaminée si elle contient plus de 10^6 bactéries vivantes/gramme). Une première cuisson préserve les spores ; l'aliment est refroidi à température ambiante, puis servi froid ou légèrement réchauffé, ce qui provoque la réactivation des spores. Les symptômes sont liés à la libération d'entérotoxine à partir des bactéries lysées dans l'intestin.

III - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Expérimental

L'injection intramusculaire d'une culture de *C. perfringens* au cobaye entraîne un phlegmon diffus, gazeux, avec hémolyse, myolyse et mort en 24 heures.

B - Naturel

Différents tableaux cliniques peuvent être observés :

1. Les infections tissulaires

al Infection localisée à la peau et aux tissus mous (tissus sous-cutanés), infections évoluant lentement et souvent indolentes tels les ulcères de pied, de décubitus...

bl Cellulites et fasciites diffuses

Tous les plans superficiels de la peau sont touchés, on retrouve des abcès et la formation de gaz. En l'absence de traitement on observe une extension rapide de la fasciite et un état de choc.

cl Myonécrose et gangrène gazeuse

- post-traumatiques ou post-chirurgicales survenant entre 8 heures et 20 jours après l'événement initial. Le début se manifeste par une douleur brutale, une plaie violacée, des bulles hémorragiques, une crépitation, un écoulement sérohématique nauséabond...
- non traumatique après perforation intestinale (néoplasie par exemple),
- après avortement septique ou parfois accouchement normal, survient une septicémie post-abortum (ou post-partum) avec *gangrène gazeuse utérine*, avec ictère intense, hémolyse, insuffisance rénale aiguë.

On peut aussi retrouver *C. perfringens* dans divers pus, abcès abdominaux, abcès pulmonaires, pleurésies, liquides péritonéaux, avec ou sans signes locaux ou généraux.

A noter que dans certains prélèvements *C. perfringens* n'est pas seul, mais volontiers associé à d'autres anaérobies, et/ou à des bactéries aérobies-anaérobies facultatives.

2. Les affections digestives

a/ Les toxi-infections alimentaires

Les symptômes débutent 8 à 12 heures après le repas infectant (viandes notamment) avec crampes abdominales et diarrhée, nausées, fièvre, rarement vomissements. Les troubles diminuent dans les 24 heures.

Le type A est impliqué dans ces toxi-infections alimentaires collectives.

Cette étiologie serait à l'origine de 15 % des intoxications alimentaires bien que l'incidence véritable des toxi-infections alimentaires à *C. perfringens* soit sans doute sous-estimée en France.

bl Entérites nécrosantes

Cette toxi-infection rare a été décrite en Allemagne sous le nom de "Darmbrand" et en Nouvelle Guinée sous celui de "pig-bel".

C'est une affection associant diarrhée hémorragique et gangrène spontanée de l'intestin grêle dont le pronostic est sombre.

Une toxine bêta produite par *C. perfringens* de type C est normalement dégradée rapidement par les enzymes protéolytiques de l'intestin or cette dégradation serait inhibée en cas de malnutrition ou par certains aliments inhibant la trypsine (patates douées).

3. Les septicémies et les bactériémies

Le tableau classique était représenté par les septicémies du post abortum, marquées par un ictère hémolytique et une insuffisance rénale grave. Le pronostic de cette infection, à point de départ utérin, était particulièrement sombre. Cette pathologie a pratiquement disparu dans nos régions depuis la législation sur l'IVG. Il ne faut cependant pas négliger cette possibilité et l'évoquer dans les pays en voie de développement.

Les bactériémies simples à *C. perfringens* se rencontrent de nos jours chez des malades hospitalisés et présentant les pathologies les plus diverses. Une seule hémoculture positive se discutera en fonction des données de la clinique.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie de la forme végétative

- Bacilles à Gram positif, trapus à bords parallèles et à bouts carrés de 1 u.m sur 3-4 u.m, immobiles. Isolés ou en courtes chaînettes ; en fonction du stade de croissance, on peut observer des formes filamenteuses au début ou des sphéropastes dans les cultures vieilles. Sur la préparation, les corps bactériens gardent irrégulièrement les colorants.
- On observe une capsule dans les produits pathologiques.

B - Spore et sporulation

- Les spores clostridiennes typiques sont déformantes et subterminales.
- La sporulation n'est obtenue que dans des milieux complexes (milieux **Ellner**, SEC, DS : Duncan et Strong)
- On distingue en fonction de la *thermorésistance* deux types de spores :
 - thermosensibles détruites à 100°C en 5 secondes : souches de myonécrose
 - thermorésistantes détruites à 100°C en 60 minutes, souches d'intoxications alimentaires. La production d'entérotoxine a lieu pendant la sporulation (présence d'une inclusion paracristalline).

C - Culture

- Bactérie anaérobie stricte, mais relativement tolérante à l'oxygène. Si elle peut pousser jusqu'à 44°C, la température optimale est de 37°C et le pH optimal est de 6,6-7 (tolérance de 5 à 9).
Une croissance rapide est obtenue sur milieux contenant des acides aminés, des vitamines, des hydrates de carbone.
- En gélose profonde, on observe des colonies lenticulaires, avec formation de gaz importante.
- En surface, colonies convexes, rondes (3-4 mm) en 24 heures, blanchâtres, avec parfois bord rhizoïde.
- Sur gélose au sang, on observe une large zone d'hémolyse pour les souches toxigènes, mais le diamètre varie selon les souches. Le type A donne une

hémolyse totale (hémolysine thêta) autour de la colonie, hémolyse qui peut être inhibée par du sérum *anti-perfringens* A, puis une zone d'hémolyse incomplète liée à la toxine alpha (phospholipase C) surtout visible après séjour à 4°C et qui présente un effet synergique, avec le CAMP factor de *S. agalactiae* (97 % des souches).

D - Caractères biochimiques

- La protéolyse est faible : liquéfaction de la gélatine en 24-48 heures, coagulation du lait cystéiné rapide (acidification, rétraction du caillot), H₂S (+), indole (-), uréase (-).
- Les glucides sont fermentés avec gaz : glucose, lactose, saccharose, maltose. Les produits terminaux de la fermentation du glucose (chromatographie en phase gazeuse) sont les acides acétique et butyrique ainsi qu'une petite quantité d'acide propionique.
- La phospholipase C est mise en évidence sur une gélose à l'œuf sous la forme d'une opalescence autour des colonies, inhibée par un sérum *anti-perfringens* A (test de Nagler). Ce caractère est généralement positif pour toutes les souches.
- Absence de lipase sur gélose à l'œuf ou à la tributyrine.

E - Toxines et autres substances produites

Différents composants ont été individualisés :

I. *Toxines létales-nécrosantes* (Tableau I)

al Toxine alpha, hémolytique

II s'agit :

- d'une phospholipase C retrouvée dans tous les types A-B-C-D-E
- d'une exotoxine produite durant la phase exponentielle
- d'une protéine de 43 kDa, dont la synthèse est favorisée par le fer, le fructose, certains acides aminés...

Elle agit :

- par destruction des membranes des globules rouges (hémolyse), des plaquettes d'où les troubles de la coagulation.
- en provoquant une inactivation de l'ATPase musculaire.

Elle entraîne une myonécrose (type A).

TABLEAU I
CLASSIFICATION DE *C. PERFRINGENS*
EN FONCTION DU TYPE DE TOXINE

<i>C. perfringens</i> type	Toxines produites				
	Alpha	Bêta	Epsilon	Iota	Entérotoxines
A	+				+
B	+	+	+	-	ND
C	+	+	-	-	+
D	+	-	+	-	+
E	+	-	-	+	ND

ND : non déterminé

bl Toxine bêta (40 kDa) non hémolytique qui a surtout un pouvoir pathogène chez les animaux (types B et C) ; plus rarement chez l'homme.

cl Toxine epsilon (34 kDa) non hémolytique, synthétisée sous forme de protoxine. Elle est activée par la trypsine ; elle provoque des nécroses sous-endocarditiques et du parenchyme rénal (types B et D)

dl Toxine iota (120 kDa) non hémolytique, activée par les protéases ; elle augmente la perméabilité vasculaire, surtout chez les animaux (type E).

2. Entérotoxine

L'entérotoxine est produite par les souches de type A, responsables d'intoxications alimentaires. Cette toxine thermolabile (35 kDa) est produite lors de la sporulation, le gène a été cloné et sa séquence est connue.

L'entérotoxine est libérée après lyse des bactéries sporulées à l'intérieur de l'intestin ; elle se fixe sur les cellules épithéliales au niveau de récepteurs (iléon). La toxine induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et par une altération de la perméabilité membranaire provoque une perte de liquide, d'ions et de petites molécules par les cellules intestinales.

3. Facteurs enzymatiques « non toxiques » (tableau n)

TABLEAU n
AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE PRODUITS PAR *C. PERFRINGENS*

« Toxine »	Activité toxique	Commentaires
Gamma	létale	Rôle modéré dans la maladie
Delta	hémolytique <i>in vitro</i>	Produit par des souches B et C
Eta	létale	Rôle modéré dans la maladie
Thêta	hémolytique, létale	Produite par la plupart des types
Kappa	nécrosante pro-collagénase	Produite par tous les types joue un rôle important dans la myonécrose
Lambda	protéase	Produite par la majorité des souches de type B et E, et quelques type D
Mu	hyaluronidase	Rôle modéré dans la maladie produite par les types A et B et quelques types C et D
Nu	désoxyribonucléase	Produite par toutes les souches sauf B d'entérite nécrosante. Rôle pathogène modéré.

F - Antigènes

Il existe environ 50 sérotypes pour les souches d'intoxications alimentaires, les souches responsables de myonécrose ne sont généralement pas typables.

La sérotypie est surtout intéressante dans le cadre d'études épidémiologiques (comparaison de souches intestinales et de souches trouvées dans les aliments au cours de toxi-infections alimentaires).

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Isolement de *C. perfringens*

1. Prélèvements

- Hémoculture en anaérobiose.
- Pus qui ont souvent une odeur putride. On prélève à l'aide d'une seringue dont on chasse l'air et que l'on bouche, ou bien on utilise des milieux de transport contenant un agent réducteur.
- Pièces anatomiques : appendice, myonécrose... le transport comme la mise en culture doivent, tout comme pour les pus, être réalisés rapidement.
- Dans le contexte d'une intoxication alimentaire la recherche et le dénombrement du germe dans les selles sont utiles pour poser le diagnostic. Il est souhaitable de disposer de tous les aliments suspects. Les critères bactériologiques pouvant confirmer l'origine alimentaire de l'intoxication sont les suivants : un nombre de germes $> 10^5$ /g d'aliment, un nombre de spores $> 10^6$ / g de selles, l'isolement d'un même sérotype chez les patients, la détection de l'entérotoxine dans les selles (électrosynérèse, test latex, Elisa).

2. Examen direct

Cet examen est toujours indispensable sur des pus ou des liquides internes. L'observation de bactéries ayant la morphologie de *Clostridium* permet de mettre en œuvre sans retard une antibiothérapie adaptée, il s'agit en effet d'une **urgence**, qui ne peut attendre, bien souvent, les résultats de la culture.

3. Cultures

Elles sont effectuées

- soit en milieu liquide pour anaérobies avec réducteur ou préalablement régénéré tels que milieu au thioglycolate ou bouillon VF, TGY, PGY, milieu de Rosenow,
- soit en milieu solide, gélose au sang, éventuellement rendue sélective par addition de néomycine (0,1 %). Les milieux solides sont placés en jarre anaérobie, à moins que l'ensemble des manipulations ne soit effectué dans une chambre anaérobie.

Les *C. perfringens* sont en fait assez résistants, même en présence d'oxygène. Leur culture est facile en anaérobiose en produisant du gaz.

Sur gélose au sang, on observe un halo caractéristique de double hémolyse.

4. Identification

Le caractère immobile d'un *Clostridium* peut déjà orienter vers *C. perfringens*.

Le diagnostic définitif d'espèce repose :

- sur la fermentation du lactose et du saccharose,
- sur la recherche d'une lécithinase, et sur l'inhibition de cette activité enzymatique avec un sérum *anti-perfringens* A (test de Nagler, de Willis).

Les éléments du diagnostic différentiel figurent dans le tableau d'introduction du chapitre *Clostridium* (Tableau I).

Dans un flacon d'hémoculture, le diagnostic de *C. perfringens* doit être évoqué d'emblée devant le caractère **très gazogène**, l'hémolyse du sang et sur la visualisation de gros bacilles à Gram positif ; cette constatation doit entraîner une information immédiate d'une suspicion de septicémie à *C. perfringens*.

B - Mise en évidence directe de l'entérotoxine

Elle est effectuée dans les fèces ou dans les aliments dans un contexte d'intoxication alimentaire ; différentes techniques sont proposées : agglutination de particules de latex sensibilisées, électro-synérèse, techniques ELISA. Une sonde oligonucléotidique de synthèse permettant la détection du gène de l'entérotoxine vient d'être utilisée.

VI - TRAITEMENT

A - Prophylaxie

- Toutes les plaies doivent systématiquement être désinfectées avec des antiseptiques puissants. On doit procéder à l'ablation de tous les corps étrangers et au parage soigneux des plaies.
- Une antibioprophyllaxie est utilisée en chirurgie viscérale (associant une bêta-lactamine et le métronidazole). En cas de chirurgie sale, de rupture de viscères, de plaies traumatiques, l'antibiothérapie sera prolongée ; il en sera de même pour les amputations chez un ischémique ou des fractures ouvertes vues tardivement.

B - Traitement curatif

Le traitement des infections tissulaires et systémiques repose sur l'usage de la pénicilline G (10 à 50 millions unités/jour), ou l'ampicilline. Certaines céphalosporines sont parfois moins actives.

On a observé des résistances plasmidiques pour : tétracycline, chloramphénicol, macrolides et lincosamides.

La sérothérapie est abandonnée. L'oxygénation hyperbare en caisson dans des centres spécialisés est une possibilité thérapeutique complémentaire. Le geste chirurgical occupe la première place dans le traitement des gangrènes gazeuses et nécessite l'exérèse des tissus nécrosés.

Le pronostic reste redoutable, ainsi dans une étude multicentrique française on avait noté 34 % de décès liés directement à la gangrène et 10 % de décès par autre cause. La mortalité était très comparable dans les cellulites et les myonécroses.

Le pronostic est plus sombre dans les gangrènes post-opératoires que post-traumatiques.

Les infections digestives ne nécessitent habituellement qu'une thérapeutique symptomatique, elles demandent plutôt une prophylaxie efficace dans la chaîne alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE

Une bibliographie importante peut être trouvée dans l'ouvrage « Les Anaérobies, Microbiologie-Pathologie », Masson, Paris, 1981.

BIRKHEAD G., VOGT R.L., HEUN E.M. *et al.* « Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fécal culture and fécal enterotoxin measurement », *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 471-474.

FINEGOLD S.M., GEORGE W.L. « Anaerobic Infections in Humans » Académie Press, San Diego, 1989.

HATHEWAY C.L. « Toxigenic Clostridia », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1990, **3**, 66-98.

LECLERC H., MOSSER D.A.A., « Microbiologie. Le tube digestif, l'eau, les aliments » Doin Ed. Paris 1989.

SCHEFTEL J.M., HADDAD J., POPOFF M., HERB D. « Diarrhées à *Clostridium perfringens* type A dans un hôpital psychiatrique : mise en évidence d'une entérotoxine dans les selles, prévalence du sérotype 1 et caractérisation des souches », *Méd. Mal. Infect.*, 1989, **19**, 74-79.

CLOSTRIDIUM TETANI

Clostridium tetani, anciennement appelé bacille de Nicolaïer, est un bacille à Gram positif sporulé, anaérobie strict, qui libère une exotoxine neurotrope entraînant une toxi-infection redoutable : le tétanos. Malgré l'existence d'un vaccin efficace, le tétanos n'est pas une maladie rare.

HISTORIQUE

Déjà décrit par Hippocrate, le tétanos a été bien étudié par Larrey durant les campagnes napoléoniennes.

Nicolaïer reproduit le tétanos en 1884 en inoculant de la terre à divers animaux et évoque un poison à effet strychnine.

Kitasato, en 1889, isole la bactérie en utilisant la propriété de thermo-résistance conférée par la spore et en cultivant en anaérobiose. L'année suivante Knud-Faber démontre l'existence de la toxine. En 1923, Gaston Ramon découvre l'anatoxine. Ultérieurement, de nombreux travaux se poursuivent sur la physiopathologie, la clinique et la thérapeutique, mais il persiste de nombreuses inconnues et la mortalité de la maladie reste élevée.

1 - CLASSIFICATION

Au sein des 4 groupes de *Clostridium*, *C. tetani* figure dans le groupe IV, c'est-à-dire parmi les *Clostridium* non protéolytiques, non glucidolytiques.

Le GC % des souches est compris entre 25 et 26.

LE TÉTANOS EN CHIFFRES

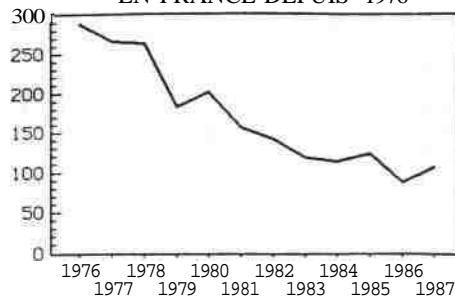
En France : nombre de cas annuels déclarés

1975	369 cas
1980	186 cas
1985	124 cas
1986	88 cas
1987	104 cas
1988	72 cas
1989	63 cas

En moyenne entre 100 et 200 cas annuels

Morbidité en France en 1980 0.3/100 000 habitants

NOMBRE DE CAS DE TETANOS DECLARES
EN FRANCE DEPUIS 1976



source : Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire

II - HABITAT - TRANSMISSION

C. tetani se trouve dans le sol où il persiste indéfiniment grâce à sa spore. Il est rare dans les zones non habitées et les forêts, la spore est surtout abondante dans des zones contaminées et on peut parler de zones tétanigènes (Nord et Est de la France notamment). Dans certaines zones, on a trouvé que 40 % des échantillons de sol contenaient *C. tetani*.

Le germe est également présent dans l'intestin et dans les déjections de l'homme et de divers animaux (chevaux, bovidés).

Il peut aussi être retrouvé dans les poussières, les eaux, voire dans l'environnement hospitalier (plâtre, talc, coton...).

Le germe peut pénétrer dans l'organisme :

A - A la faveur de lésions diverses

- importantes : plaies souillées de terre, avec corps étrangers, délabrements contenant éventuellement d'autres anaérobies ou des associations anaérobies-aérobies,
- minimales : piqûres, excoriations, échardes, morsures...,
- chroniques : ulcères, escarres, brûlures...

B - A la faveur d'un acte qui n'est pas accompagné d'une aseptie suffisante

- chirurgical : intervention sur l'intestin, fracture ouverte,
- médical : piqûres intramusculaires effectuées avec du matériel non stérile, éventuellement avec des produits favorisant (quinine, anti-inflammatoires, acide lactique...), piqûres chez les toxicomanes,
- obstétrical : le tétanos ombilical du nouveau-né reste fréquent dans les pays en développement.

Le tétanos atteint plus fréquemment les sujets âgés, notamment les femmes, dont les rappels de vaccination sont souvent oubliés (figure 1).

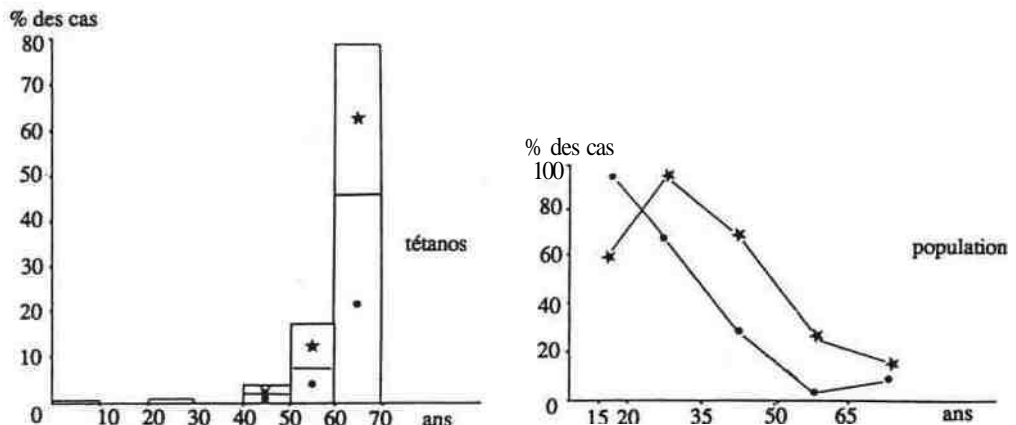


FIGURE 1
RÉPARTITION DES CAS DE TÉTANOS EN FRANCE EN 1979-1980

en fonction de l'âge et du sexe (hommes *, femme •) et en comparaison fréquence des sujets protégés (taux d'anticorps antitétaniques supérieurs à 0,025 UI H.A.) à Clermont Ferrand en 1975 dans la population locale adulte en fonction de l'âge et du sexe.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

L'infection débute par l'introduction des spores de *C. tetani* dans l'organisme à la faveur d'une effraction cutanée. Puis, sous l'influence de facteurs abaissant le potentiel redox (germes associés, certains médicaments), les spores qui se trouvent dans des conditions d'anaérobiose vont germer et redonner la forme bactérienne produisant la toxine tétanique *in situ*. *C. tetani* produit deux exoprotéines, une hémolysine (tétanolysine) et une neurotoxine (tétanospasmine). Cette dernière étant seule responsable de la maladie.

A - Propagation de la neurotoxine tétanique

Produite au niveau de la plaie « porte d'entrée », la toxine gagne le système nerveux central où elle s'accumule en utilisant deux voies :

- la voie hématogène, c'est le cas du tétanos généralisé descendant,
- la voie nerveuse rétrograde, c'est le tétanos ascendant.

La toxine remonte le long des axones des motoneurones alpha (par neuroprobasie) dans le sens suivant :

terminaisons nerveuses musculaires → tronc nerveux → racines ventrales → substance grise des cornes antérieures de la moelle.

Ceci explique que dans cette forme, la période d'incubation est inversement proportionnelle à la distance qui sépare la porte d'entrée du système nerveux central.

B - Cibles de la toxine

La toxine, d'un poids moléculaire de 150 kDa, se fixe au niveau de certains lipides du tissu nerveux (Van Heyningen, 1959). Les récepteurs sont les gangliosides GT1B (trisialo-ganglioside) et GD1B (disialo-ganglioside) contenant dans leur formule :

- deux unités de galactose,
- une N-acétylgalactosamine,
- deux à trois unités d'acide N-acétylneuraminique (= acide sialique). Cette dernière structure est indispensable à la fixation de la toxine.

Une fois fixée sur son récepteur, la toxine agit sur sa cible moléculaire encore inconnue et provoque une paralysie spastique.

C - Mode d'action

La neurotoxine tétanique :

- bloque les influx inhibiteurs s'exerçant sur les motoneurones alpha en agissant au niveau présynaptique,
- inhibe la libération de différents médiateurs du système nerveux central : acide gamma-aminobutyrique, glycine...
- provoque une augmentation de la libération de l'acétylcholine et une diminution de l'activité cholinestérasique.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Chez l'animal

La toxine est active chez les mammifères, notamment chez le cheval, la souris, le cobaye. L'injection de la toxine par voie IV provoque un tétanos généralisé ou descendant, par voie IM un tétanos ascendant.

B - Chez l'homme

1. *Forme habituelle : le tétanos aigu généralisé*

L'incubation a une durée variable de 3 à 30 jours, mais elle se situe généralement entre 3 et 15 jours. Cette incubation est habituellement silencieuse et on n'est pas alerté par la porte d'entrée qui ne présente, bien souvent, pas de signes d'inflammation locale.

Les plaies sont d'origine traumatique dans 2 cas sur 3, et 1 fois sur 5 elles sont de type chronique (par exemple, ulcère variqueux). Le plus souvent les plaies sont minimes et n'attirent pas l'attention. Une fois sur dix, aucune porte d'entrée n'est retrouvée.

Le symptôme inaugural est le **trismus**, contracture des masséters bloquant l'ouverture de la bouche. Puis les contractures se généralisent, s'étendant aux muscles de la face d'où le faciès sardonique, puis aux muscles vertébraux, à la nuque, au tronc... Le ventre est « de bois » et les membres sont atteints (supérieurs en flexion, inférieurs en extension), le rachis dorso-lombaire est creusé, d'où l'attitude en opisthotonos.

Les contractures permanentes se renforcent à l'occasion de paroxysmes provoqués par des stimulations diverses (bruit, lumière, contact). Les crises sont très douloureuses provoquant des postures diverses (opisthotonos, orthotonos...), la fonction respiratoire peut être touchée.

C'est une maladie non fébrile. Le pronostic varie selon les scores de gravité.

2. *On distingue différentes formes cliniques*

- tétanos céphalique lié à une porte d'entrée faciale,
- tétanos localisé des membres,
- formes particulières :
 - post abortum,
 - ombilical redoutable chez le nouveau-né dans les pays en développement,
 - post injection de sombre pronostic.

Il est important de souligner que la maladie n'est pas immunisante.

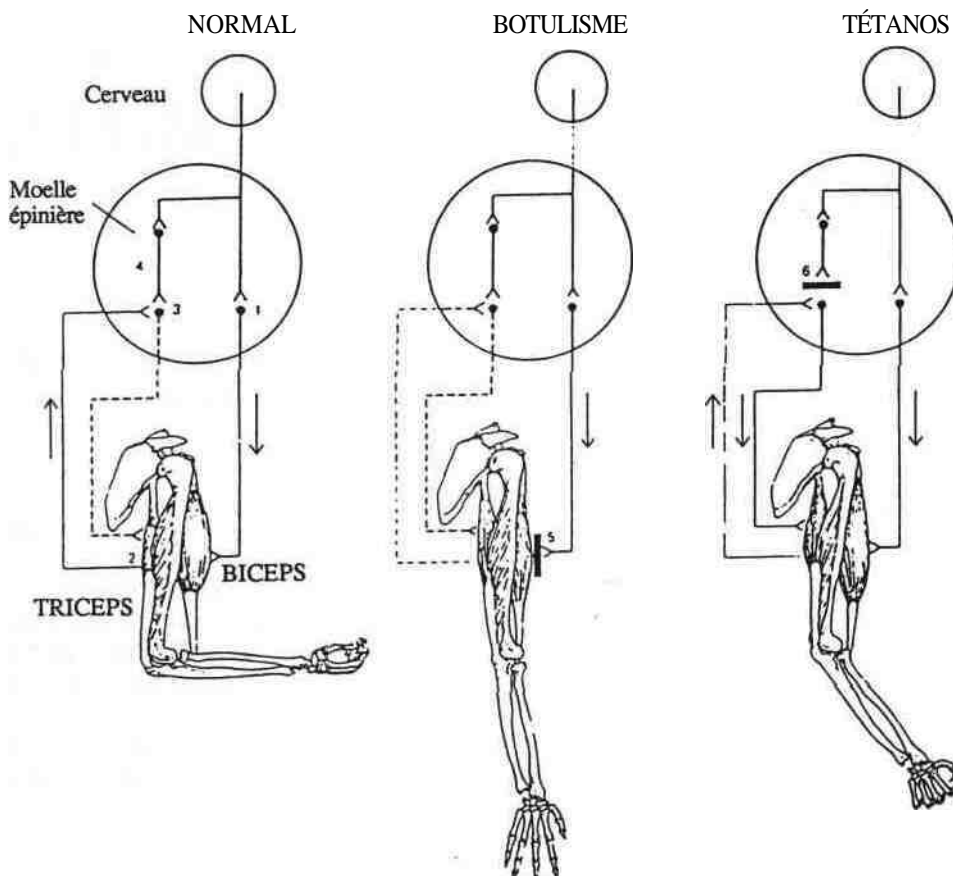


SCHÉMA
DE L'INNERVATION MUSCULAIRE : D'APRÈS VAN HEYNINGEN

chez le sujet normal, lors de l'excitation du biceps (1), l'arc réflexe sensori-moteur (2.3) a tendance à s'opposer à la distension du triceps. Le relâchement du triceps est assuré par l'inhibition de cet arc réflexe (4),
 dans le botulisme, la jonction neuro-musculaire est bloquée (5) entraînant une paralysie flasque,
 dans le tétanos, la toxine tétanique empêche l'inhibition du réflexe. Les deux muscles antagonistes en se contractant provoquent la contracture.

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Caractères morphologiques

C. tetani est un bacille à Gram positif, mais qui perd facilement ce caractère tinctorial, relativement long et fin (0,4 u.m x 4-8 p.m). Il a une spore terminale lui donnant classiquement un aspect en tête d'épingle. En culture, les formes longues ne sont pas exceptionnelles. Le germe est extrêmement mobile par une ciliature péritriche.

B - Caractères cultureux

C'est un germe anaérobie strict, ayant une température optimale de croissance de 37°C et un pH optimal de 7,4.

L'aspect des colonies, qui apparaissent en 48 heures, est rhizoïde et translucide ; en surface, les colonies ont tendance à essaimer. On a donc intérêt à utiliser des boîtes bien sèches.

C'est un germe peu exigeant qui pousse sur tous les milieux usuels pour anaérobies : gélose, gélose au sang, bouillon VF... en bouillon TGY une odeur de corne brûlée se dégage liée à la formation d'acroléine.

L'oxygène hyperbare tue 99,9 % des cellules.

Les spores sont détruites en 20 minutes à 121°C à l'autoclave.

C - Caractères biochimiques

Classiquement, *C. tetani* est peu protéolytique. Dans le Bergey's Manual 1986, cette espèce est considérée comme étant gélatinolytique. Elle possède des peptidases et des désaminases ; il y a production irrégulière d'H₂S et d'indole.

Les glucides ne sont pas fermentés (glucose (-), saccharose (-), lactose (-), esculine (-), amidon (-)).

Les produits terminaux de fermentation sont les acides acétique, propionique, butyrique, l'éthanol, le propanol, le butanol.

C. tetani possède une désoxyribonucléase, mais pas de lipase, ni de lécithinase.

Sur gélose au sang on note une phémolyse autour des colonies. Elle est due à une toxine, la tétanolysine, hémolysine soluble oxygénolabile, qui ne semble pas jouer de rôle pathogène, mais qui est antigénique. Il existe peut-être une autre hémolysine de haut poids moléculaire.

Du point de vue des caractères biochimiques, *C. tetani* se rapproche de *C. cochlearium* et *C. tetanomorphum*, mais se distingue par son pouvoir pathogène et les différences d'hybridation ADN/ADN.

D - La toxine tétanique : la tétanospasmine

C. tetani produit deux exotoxines, la tétanospasmine responsable des symptômes de la maladie et la ténanolysine.

1. Production

L'excrétion dans le milieu durant la phase de croissance est partielle. La majeure partie de la toxine reste à l'intérieur de la bactérie, n'étant libérée que lors de l'autolyse ; la toxine peut représenter jusqu'à 10 % du poids sec de la bactérie. La synthèse est favorisée par certains acides aminés (serine, glutamine et peptides à base d'histidine).

La production de toxine ne serait pas liée à un état lysogène des souches.

2. Propriétés

Le gène codant pour la toxine est porté par un plasmide et a entièrement été séquencé. Au stade endocellulaire, la toxine est un polypeptide de 150 kDa, lors de l'excrétion elle est clivée par une protéase en deux fragments reliés par un pont disulfure

- une chaîne légère de 50 kDa (L)
- une chaîne lourde de 100 kDa (H)

Chaque fragment pris isolément n'est pas toxique.

Il n'existe qu'un seul type antigénique.

3. Toxicité

Il s'agit d'une toxine puissante puisque 1 mg de toxine correspond à 10^7 DL50 souris. La DMM de la souris est de 2×10^5 u.g. La toxicité pour l'animal dépend de la voie d'administration.

On titre la toxine soit par le test de floculation de Ramon (Unités floculantes), soit en déterminant la dose minimale mortelle DMM sur souris de 20 g ou cobaye de 350 g, une unité floculante (UF) = 3 000 DMM cobaye = 10 000 DMM souris.

4. Les anticorps anti-toxine

Ils neutralisent tous les effets biologiques de la toxine. On peut les obtenir :

- soit à partir d'individus hyperimmunisés,
- soit à partir de chevaux hyperimmunisés.

Ces anticorps ne passent pas la barrière hémoméningée.

5. L'anatoxine

Elle est très immunogène chez l'homme, le cheval et les animaux de laboratoire (lapin, cobaye). Elle entraîne la formation d'anticorps anti-toxine, neutralisants et précipitants. La réponse immunitaire est accrue grâce à des adjuvants (phosphate de Ca, hydroxyde d'aluminium).

La toxine peut être détoxifiée et transformée en anatoxine par le formol (0,5 %) à 40°C durant une semaine. L'anatoxine conserve intact le pouvoir immunogène de la toxine. Cette transformation est liée au blocage des résidus lysyl de la molécule grâce à la formation de liaisons méthyléniques stables.

E - La tétanolysine

C. tetani produit une hémolysine, la tétanolysine, oxygène sensible ; elle est fonctionnellement et sérologiquement apparentée à la streptolysine 0 ainsi qu'aux hémolysines produites par d'autres *Clostridium*. Cette hémolysine altère érythrocytes, leucocytes, plaquettes, macrophages et fibroblastes. Son rôle réel dans la physiopathologie de l'infection est encore mal connu.

VI - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DU TÉTANOS

Le rôle du laboratoire est secondaire, le diagnostic étant presque exclusivement clinique. Le bacille tétanique reste toujours localisé au niveau de son point de pénétration, il ne diffuse jamais, il n'y a pas de septicémie.

Au moment du prélèvement (au début des symptômes de tétanos), dans 75 % des cas, le germe a disparu de la plaie au profit d'autres espèces bactériennes.

A - Diagnostic direct

On cherche rarement à isoler *C. tetani* au niveau de la porte d'entrée, d'autant plus que les résultats de la culture sont aléatoires. On peut prélever de la sérosité et :

- ensemercer en double le prélèvement tel quel et après chauffage pour ne garder que les spores, sur milieu solide (milieu VL ou TGY),
- inclure dans les boîtes du sérum antitétanique, les colonies apparaissant alors après 3 à 4 jours à 37°C entourées d'un halo,
- inoculer une partie du prélèvement à l'animal pour tenter de reproduire la maladie expérimentale chez la souris.

Les caractéristiques morphologiques et biochimiques du germe permettant l'identification de *C. tetani* ont été précédemment décrites.

Il y a lieu de conduire en parallèle des cultures en aérobiose, pour détecter soit une association (aérobies-anaérobies), soit une substitution par des pyogènes notamment.

B - Diagnostic indirect

Il n'est pas possible de déceler de la toxine circulante ; en effet la toxémie est très transitoire, cette substance étant fixée immédiatement sur le tissu nerveux.

On ne peut doser les anticorps antitétaniques dans la perspective d'un diagnostic de tétanos, car au cours de la maladie, la quantité de toxine libérée est suffisante pour provoquer la maladie, mais insuffisante pour provoquer une stimulation antigénique.

Le dosage des anticorps sériques est par contre intéressant pour étudier la situation immunitaire d'une population (et vérifier la corrélation en fonction des tranches d'âge entre les cas de tétanos et la baisse de l'immunité) (figure 2) et pour vérifier la réponse à une vaccination.

On dispose de plusieurs techniques de dosage des anticorps antitétaniques :

- contre-immunoelectrophorèse,
- agglutination de particules de latex, hémagglutination,
- techniques immunoenzymatiques (ELISA),
- techniques radioimmunologiques (RIA).

VII - TRAITEMENT

A - Traitement préventif

La meilleure prévention consiste en une bonne vaccination ; pour la quasi totalité des sujets présentant un tétanos, la vaccination antérieure est inexistante, méconnue ou très ancienne, le dernier rappel remontant à plus de 10 ans. La séroprévention est une pratique coûteuse et qui ne confère pas une protection absolue (4 à 7 % des tétanos surviennent malgré une séroprévention).

1. La vaccination antitétanique

Bien administrée, elle confère une protection voisine de 100 %. Des progrès ont été réalisés, durant ces dernières années pour le vaccin, l'anatoxine purifiée est plus concentrée et adsorbée sur un adjuvant minéral (phosphate de calcium pour IPAD-T Pasteur et hydroxyde d'aluminium pour le Tetavax Mérieux). Ces deux principaux vaccins distribués en France, confèrent une immunité certaine en 2 injections, à condition qu'elles soient espacées de plus de 2 mois et qu'un rappel soit effectué après un an. Toute injection ultérieure survenant plusieurs années plus tard et même plusieurs dizaines d'années plus tard entraîne une réponse de type secondaire.

Le vaccin est administré par voie intramusculaire ou sous-cutanée (en zone scapulaire ou au bras), il est bien toléré (réaction seulement chez 1 à 3 % des vaccinés). Les accidents neurologiques sont exceptionnels : 1 cas pour 2,5 millions de doses. Il n'y a pas de contre-indications. La grossesse n'est pas une contre-indication, la vaccination est même recommandée chez les femmes enceintes dans les pays en voie de développement pour éviter le tétanos néonatal.

L'anatoxine tétanique est souvent associée à l'anatoxine diphtérique (DT), au vaccin anticoquelucheux (DT-coq), ou antipoliomyélite (DT-coq polio ou tétracoq).

On conseille en France le calendrier vaccinal suivant :

- à partir de 3 mois DTCP (3 injections à 4 semaines au moins d'intervalle)
- à partir de 15-18 mois rappel DTCP,

- à 5-6 ans rappel DTP,
- à 11-13 ans rappel DTP,
- à 16-21 ans rappel DTP ou TP,
- au-delà tous les 10 ans T ou TP,
- au-delà de 60 ans ou au départ à la retraite rappel ou revaccination complète.

Enfin, le vaccin peut être administré simultanément avec une injection de sérum antitétanique ou d'immunoglobulines spécifiques sans altérer la réponse immunitaire.

On considère que le taux protecteur d'anticorps antitoxine se situe à partir de 0,01 ou même 0,025 U/ml de sérum (selon les différents auteurs). Le taux de couverture vaccinal, chez les enfants se situant en France entre 90 et 95 %.

TABLEAU 1
CONDUITE A TENIR POUR LA PRÉVENTION DU TÉTANOS CHEZ UN BLESSÉ
ET TOUTE PERSONNE OCCASIONNELLEMENT EXPOSÉE
 (d'après le « Guide pour la prévention du tétanos »)

Situation vaccinale du patient	Nature de l'exposition	
	(a)	(b)
1. Vaccination antérieure certaine et complète (au moins deux injections de vaccin suivies d'un rappel, quelque soit leur ancienneté) Ancienneté du dernier rappel : - moins de 5 ans - 5 à 10 ans - plus de 10 ans	Rien Rien Vaccin (rappel)	Rien Vaccin (rappel) Vaccin (rappel) + sérum (1)
2. Vaccination antérieure certaine mais incomplète (au moins une injection de vaccin)	Vaccin (2)	Vaccin (2) + sérum (1)
3. Vaccination absente ou douteuse	Vaccin (2) + sérum (1)	Vaccin (2) + sérum (1) (double dose)

(a) Plaies minimes y compris piqûres, coupures, excoriations peu pénétrantes, non souillées, sans corps étranger. On peut placer dans cette catégorie certaines plaies non traumatiques (ulcère de jambe) et toutes interventions chirurgicales : particulièrement intervention sur le pied, le tube digestif, l'utérus, une fracture ouverte.

(b) Plaies traumatiques étendues, pénétrantes, avec corps étrangers, souillées ou traitées tardivement (après 24 h), état de choc avec forte hémorragie, délabrement ostéo-musculaire. Expositions non traumatiques : brûlures étendues, avortements septiques, accouchements septiques, gelures, ulcères nécrotiques, gangrènes.

(1) Sérum hétérologue d'origine animale (au moins 1500 U.I.) ou immunoglobulines humaines antitétaniques (au moins 250 U.I. soit une ampoule).

La dose sera doublée en cas de risque (b) lorsque la vaccination antérieure est douteuse ou inexistante.

(2) La vaccination sera complétée ultérieurement selon le schéma simplifié conseillé actuellement. S'il s'agit de la première injection vaccinale reçue par le patient, prévoir la deuxième injection après quatre semaines, et le rappel six mois à un an plus tard. S'il s'agit de la deuxième injection vaccinale reçue par le patient, seul le rappel est nécessaire, six mois à un an plus tard.

2. La sérothérapie

Le sérum purifié administré à raison de 1500 U en injection sous-cutanée par la méthode de Besredka, protège au maximum pendant 20 jours. Les gammaglobulines spécifiques (Tétaglobulines) administrées par voie intra-musculaire (ampoule de 250 UI) assurent une protection pendant 1 mois et mettent à l'abri de la maladie sérique, mais sont d'un coût élevé.

Cette sérothérapie doit être associée à la vaccination.

La conduite à tenir pour la prévention du tétanos chez un blessé ou pour toute personne exposée est clairement définie dans le guide de la prévention du tétanos dû au Ministère de la Santé (Tableau I). Les sujets âgés sont tout particulièrement concernés. La prévention repose sur la vaccination. Lorsque la vaccination est ancienne, il est conseillé de réitérer l'injection de rappel :

- chez les personnes âgées de plus de 60 ans dont la dernière vaccination remonte à plus de 20 ans,
- chez les personnes dont la vaccination antérieure a été incomplète (moins de 3 injections).

Il faut saisir toutes les occasions de contact individuel avec les services de santé pour vacciner ou revacciner les sujets âgés :

- toute consultation médicale,
- visite systématique à la prise de retraite,
- vaccination dans les collectivités gériatriques, maisons de retraite, hôpitaux, lors de l'entrée en institution.

B - Traitement curatif

Il est effectué dans des centres spécialisés, ce sujet ne sera pas développé ici, nous rappellerons seulement le principe de ce traitement.

- Thérapeutique à visée spécifique :

- traitement de la porte d'entrée (parage...),
- antibiothérapie systématique par voie générale (pénicilline G à raison de 4 millions d'unités par jour chez l'adulte),
- sérothérapie curative par voie générale,
- vaccination, car le tétanos n'est pas immunisant et les récurrences ne sont pas exceptionnelles.

- Thérapeutique à visée symptomatique :

- isolement sensoriel,
- sédatifs (barbituriques) et **médicaments myorelaxants** (diazepam),
- réanimation respiratoire,
- réanimation hydroélectrolytique et nutritionnelle.

Pronostic

Dans les centres de soins intensifs, en France, la mortalité globale est de 11 à 33 %, elle atteint 50 % chez les plus de 80 ans. Les pourcentages de décès sont plus élevés dans les pays en développement.

BIBLIOGRAPHIE

BEYTOUT J. , « Actualités de la prévention du tétanos » , *Concours Méd.*, 1990, 112-11, **973-978**.

COTTIN J.F., « Le tétanos en France. Enquête rétrospective auprès des services hospitaliers. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 1987,**10**, 37-39.

COTTIN J.F., « Le tétanos en France en 1985 », *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*, 1986, **40**,157-158.

Guide pour la Prévention du tétanos. Monographie du Ministère de la Santé et de la Sécurité Sociale, 1980.

NOUAILHAT F., « Le tétanos. Épidémiologie, étiologie, physiopathologie, diagnostic, évolution et pronostic, principes du traitement » , *Rev. Prat. (Paris)*, 1988,**38**, 1767-1771.

PÉCHÈRE J. C., FEKETE F., « Infections des plaies » in *Les Infections*, Î.C. Péchère et coll. De Edisem, Québec-Maloine, Paris, 1983.

VAN HEYNINGEN W. E., « Tetanus in Immunology, » *Readings from Scientific American*. Freeman, W. H. and Co, Ed. San Francisco, 1976, 243-249.

REY M., « La vaccination contre le tétanos. Une sécurité pour tous », *Gaz. Méd. France*, 1981, **88**, 2543-2559.

Chapitre XXXI

BACILLES À GRAM NÉGATIF ANAÉROBIES

GENERALITES

La famille des *Bacteroidaceae* est constituée de plusieurs genres de bacilles à Gram négatif anaérobies stricts : *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Wolinella*, *Leptotrichia*, *Butyrivibrio*, *Succinivibrio*, *Succinimonas*, *Anaerovibrio*, *Anaerobiospirillum*, *Mobiluncus*, *Selenomonas*, *Pectinatus*, *Acetivibrio*, *Lachnospira*. Ces bactéries font partie de la flore buccale, de la flore du tractus respiratoire supérieur, de l'intestin et des voies urogénitales.

Les genres *Bacteroides*, *Porphyromonas* et *Prevotella* sont les plus importants de cette famille. Il s'agit de bacilles à Gram (-) non sporulés, anaérobies stricts, qu'ils soient mobiles ou immobiles. Ils constituent une grande partie de la flore endogène normale (cavité buccale, tractus respiratoire, digestif et urogénital) et sont responsables actuellement de plus de 50 % des infections humaines dues à des anaérobies.

mSTORIQUE

En 1920, découverte des premiers *Bacteroides* par Castelani et Chalmers.

En 1933, identification sur des critères biochimiques.

En 1938, première classification morphologique par Prévôt.

En 1990, classification génétique

CLASSIFICATION

La dernière édition du Bergey's Manual de 1984 indique les bases de cette classification. Elle est basée sur la morphologie cellulaire, la mobilité et la ciliature, les acides gras volatils ou non produits en culture et étudiés par chromatographie de partage gaz-liquide (GLC).

Groupe 1 = Bacilles non mobiles ou à ciliature péritriche

- Production d'acide butyrique
- Production d'acide lactique
- Production mixte d'acides divers

Fusobacterium
Leptotrichia
Bacteroides

Groupe n = Bacilles à diatiture polaire

- Production d'acide butyrique
- Production d'acide succinique et acétique
- Production d'acide propionique et acétique
- Production d'acide succinique par réduction de fumarate

Butyrivibrio
Succinivibrio
Succinomonas
Anaerovibrio
Wolinella

Groupe ni = Bacilles flagellés sur leur face concave

- à métabolisme fermentatif
- production d'acide propionique et acétique

Selenomonas
Pectinatus

Groupe IV = Bacilles flagellés bipolaires

Anaerobiospirillum

TABLEAU 1
 CHANGEMENTS TAXONOMIQUES RÉCENTS

Ancienne nomenclature	Nouvelle nomenclature
- <i>B. amylophilus</i>	- <i>Ruminobacter amylophilus</i>
- <i>B. asaccharolyticus</i>	- <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
- <i>B. bivius</i>	- <i>Prevotella bivia</i>
- <i>B. buccae</i>	- <i>Prevotella buccae</i>
- <i>B. buccaUs</i>	- <i>Prevotella buccalis</i>
- <i>B. capillosus*</i>	
- <i>B. coagulons*</i>	
- <i>B. corporis</i>	- <i>Prevotella corporis</i>
- <i>B. denticola</i>	- <i>Prevotella denticola</i>
- <i>B. disiens</i>	- <i>Prevotella disiens</i>
- <i>B. distasonis</i>	- inchangé
- <i>B. endodontalis</i>	- <i>Porphyromonas endodontalis</i>
- <i>B. eggerthii</i>	- inchangé
- <i>B. intermedius</i>	- <i>Prevotella intermedia</i>
- <i>B.fragilis</i>	- inchangé
- <i>B.furcosus</i>	- <i>Anaerorhabdus furcosus</i>
- <i>B. gingivalis</i>	- <i>Porphyromonas gingivalis</i>
- <i>B. gracilis*</i>	
- <i>B. heparinolyticus</i>	- <i>Prevotella heparinolytica</i>
- <i>B. hypermegas</i>	- <i>Megamonas hypermegas</i>
- <i>B. levii*</i>	
- <i>B. loescheii*</i>	
- <i>B. macacae*</i>	
- <i>B. melaninogenicus</i>	- <i>Prevotella melaninogenica</i>
- <i>B. microfusis</i>	- <i>Rikenella microfusis</i>
- <i>B. multiacidus</i>	- <i>Mitsuokella multiacida</i>
- <i>B. nodosus</i>	- <i>Dichelobacter nodosus</i>
- <i>B. oralis</i>	- <i>Prevotella oralis</i>
- <i>B. oris</i>	- <i>Prevotella oris</i>
- <i>B. oulorum</i>	- <i>Prevotella oulora</i>
- <i>B. ovatus</i>	- inchangé
- <i>B. pneumosintes*</i>	
- <i>B.praecutus</i>	- <i>Tisierella praecuta</i>
- <i>B. putredinis*</i>	
- <i>B. ruminicola</i>	- <i>Prevotella ruminicola</i>
- <i>B. splanchnicus*</i>	
- <i>B. succinogenes</i>	- <i>Fibrobacter succinogenes</i>
- <i>B. termitidis</i>	- <i>Sebaldella termitidis</i>
- <i>B. thetaiotaomicron</i>	- inchangé
- <i>B.uniformis</i>	- inchangé
- <i>B. ureolyticus*</i>	
- <i>B. veroralis</i>	- <i>Prevotella veroralis</i>
- <i>B. vulgatus</i>	- inchangé
- <i>B. zoogloformans</i>	- <i>Prevotella zoogloformans</i>

* espèces rares dont la position taxonomique au sein du genre *Bacteroides* est encore incertaine

Nous limiterons notre étude aux genres les plus fréquents en bactériologie clinique : *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*.

La dénomination ancienne du genre *Bacteroides* faisait référence à un ensemble phénotypiquement et génotypiquement très hétérogène regroupant de nombreuses espèces de bacilles à Gram (-) que l'on avait l'habitude de séparer de la façon suivante:

Pigment	Saccharolytique	Groupe	Espèce principale
	++	I	<i>B. fragilis</i>
+	+	II	<i>B. melaninogenicus</i>
+	-	III	<i>B. asaccharolyticus</i>
-	-	IV	<i>B. ureolyticus</i>

II a récemment été établi, sur la base de critères génétiques que le genre *Bacteroides* devait être restreint à *B. fragilis* et aux espèces proches : *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* et *B. vulgatus* (anciennement dénommés *Bacteroides* du groupe *fragilis*). D'autres genres ont été récemment séparés :

- le genre *Porphyromonas* regroupant les anciens *Bacteroides* pigmentés et asaccharolytiques (*B. asaccharolyticus*, *B. gingivalis*, *B. endodontalis*).
- le genre *Prevotella* comprenant les anciens *Bacteroides* non pigmentés et saccharolytiques.
- enfin d'autres genres ont été proposés, la plupart ne comportant actuellement qu'une seule espèce. Ils concernent des bacilles à Gram (-) peu répandus et inclassables (Tableau I).

LE GENRE BACTEROIDES ET LES GENRES APPARENTES

Ce sont des bacilles à Gram (-) de taille très variable, immobiles, dont le GC% varie de 35% (*B. hypermegas*) à 48% (*B. fragilis*).

Nous allons essentiellement traiter *B. fragilis* et nous contenter de quelques caractéristiques pour les autres espèces.

1 - LE GENRE *BACTEROIDES*

(Anciennement dénommé *Bacteroides* du groupe *fragilis*)

Bacteroides fragilis en est l'espèce type. Appelée à l'origine *Ristella fragilis*, elle fut isolée en 1898 par Veillon et Zuber dans le pus d'une appendicite aiguë puis par Guillemet dans une gangrène pulmonaire.

Ce sont des bacilles à Gram (-) utilisant l'hémine comme facteur de croissance. On distingue actuellement 10 espèces : *B. fragilis*, *B. vulgatus*, *B. distasonis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis*, *B. caccae*, *B. merdae*, *B. stercoris* et *B. eggerthii*.

A - Habitat et épidémiologie

Ce sont les hôtes des cavités naturelles de l'homme, surtout de l'appareil digestif et urogénital. Ils sont responsables de la majorité des infections anaérobies d'origine endogène.

B - Morphologie

Ce sont des bacilles courts de 1 à 3 u.m, immobiles, non sporulés, sphéroïdes. A la coloration de Gram, ils sont souvent pâles avec une coloration irrégulière.

C - Caractères cultureux

Ils exigent des milieux supplémentés en hémine, incubés en anaérobiose stricte.

Les milieux usuels sont représentés par la gélose au sang pré-réduit et le milieu de Wilkins-Chalgren.

La culture est lente, 24 h au minimum, imposant de garder plusieurs jours les milieux à l'étuve.

On observe alors des colonies fines, régulières et translucides.

La production de gaz est faible en milieu liquide.

Il est important que la culture soit stimulée par l'adjonction de bile fraîche à 20 %.

D - Pouvoir pathogène naturel

1. Toutes les espèces ne sont pas également pathogènes

Les anaérobies sont à l'origine de 10 % de toutes les infections bactériennes et les *Bacteroides* représentent environ le quart des anaérobies pathogènes.

Lors de ces infections, *B. fragilis* est l'espèce la plus fréquente (80 %). Cette bactérie possède une capsule polysaccharidique la rendant plus résistante à la phagocytose.

B. thetaiotaomicron est pathogène dans plus de 18 % de cas.

Par contre, les espèces *vulgatus*, *ovatus* et *distasonis* qui sont les plus fréquentes chez le sujet normal sont très rarement pathogènes.

2. Une effraction muqueuse et un terrain affaibli sont des facteurs prédisposants fréquents

L'effraction met en contact une cavité où la flore anaérobie est prédominante (buccale, colique, vaginale) avec un tissu ou avec la circulation.

Le point de départ de l'infection est une thrombophlébite suppurée locale qui peut être à l'origine d'une septicémie et de métastases septiques.

Cette effraction muqueuse peut être :

- spontanée (rupture, perforation)
 - accidentelle
 - chirurgicale (chirurgie stomatologique, digestive, gynécologique)
- Un terrain débilite est fréquemment en cause. On retrouve souvent comme causes favorisantes :

- une notion d'immunodéficience d'origine médicamenteuse ou autre,
- une pathologie associée : éthyliste, diabète, insuffisance rénale, néoplasie,
- une affection ischémiant.

3. Situations cliniques

On soupçonne le rôle pathogène d'anaérobies non sporulés devant une suppuration fétide, localisée à proximité d'une muqueuse, avec nécrose tissulaire... et lorsqu'un traitement préalable par les aminosides ou les bêta-lactamines a été inefficace.

Les tableaux se présentent sous forme :

- **de septicémies** : les *Bacteroides* étant plus fréquemment en cause que les *Fusobacterium*,
- **d'infections stomatologiques,**
- **d'infections ORL** : otites, sinusites, thrombophlébites,
- **d'infections pulmonaires** : pneumonies, abcès du **poumon, pleurésies** (*P. melaninogenica*)
- **d'infections abdominales** : appendicites, péritonites, abcès intra-abdominaux, infections périanales (*B.fragilis*),
- **d'infections gynécologiques** : post abortum, post partum, salpingites, infections pelviennes après chirurgie gynécologique,
- **d'infections du système nerveux central** : abcès du cerveau (*B. fragilis*), empyèmes sous duraux, méningites,
- **d'autres localisations** : cutanées, ostéoarticulaires...

E - Pouvoir pathogène expérimental

Quelques souches peuvent provoquer des suppurations accompagnées de cachexie et aboutissant à la mort de l'animal en 10 à 20 jours.

F - Diagnostic

1. Diagnostic bactériologique

L'isolement ne pose pas de problème particulier à condition d'avoir les milieux adaptés et de réaliser une bonne anaérobiose.

La pratique systématique de prélèvements spécifiques pour anaérobies (hémocultures, abcès de paroi, liquides pleuraux, péritonéaux ou autres) permet à l'heure actuelle de les mettre plus souvent en évidence.

La croissance est lente et demande parfois 4 à 5 jours. Dans les prélèvements où des bacilles à Gram négatif anaérobies facultatifs peuvent rendre l'isolement difficile, on utilisera un milieu sélectif additionné d'aminosides (kanamycine, gentamicine).

L'identification repose essentiellement sur une croissance favorisée en présence de bile, la recherche d'indole et l'étude de la fermentation des sucres. Les hydrates de carbone sont largement utilisés selon la voie fermentative.

Les espèces de *Bacteroides* sont très voisines, ainsi elles sont toutes : saccharose (+), lactose (+), maltose (+), xylose (+), mannose (+).

Les autres caractères à prendre en considération sont : esculine (+), gélatinase (-), lait(-), H₂S(-).

La distinction se fait sur indole, cellobiose, mannitol, arabinose, salicine, glucose, tréhalose, rhamnose, (Tableau II). L'existence de galeries miniaturisées prêtes à l'emploi permet dans ce cas un diagnostic aisé.

La chromatographie en phase gazeuse permet dans les cas difficiles de faire la distinction entre *Bacteroides* et *Fusobacterium*, mais elle n'est pas habituellement nécessaire pour différencier les espèces de *Bacteroides*. Elle pourra être utile pour séparer les espèces de *Fusobacterium* pouvant croître en présence de bile.

TABLEAU n
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES *BACTEROIDES*

	Indole	Cellobiose	Mannitol	Arabinose	Salicine	Glucose	Tréhalose	Rhamnose	Catalase
<i>B.ovatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B.thetaio-</i> <i>taomicmn</i>	+	+	-	+	-	+	+	+	+
<i>B.uniformis</i>	+	v	-	v	+	+	-	-	v
<i>B.distasonis</i>		+	-	-	+	+	+	v	+
<i>B.vulgatus</i>				+	-	+	-	+	v
<i>B.fragilis</i>						+	-	-	+
<i>B.merdae</i>					+	+	+	v	-
<i>B.caccaae</i>		+		+	v	+	+	+	-
<i>B.stercoris</i>	+	v		-	-	+	-	v	
<i>B.eggerthn</i>	+	-	-	+	-	+	-	v	-

v = variable, réaction faible

2. Diagnostic rapide

L'identification par immunofluorescence avec le sérum anti-capsule de *B. fragilis* est possible soit directement sur le produit pathologique soit à partir d'un enrichissement en milieu liquide.

II - GENRES APPARENTES

A - Les espèces pigmentées (*Prevotella*, *Porphyromonas*)

Le pigment se développe sur milieu supplémenté en hémine, vit K.3 (ménadione) et contenant 5 % de sang total ou laqué de mouton. Il apparaît dans un délai de 3 à 21 jours, cependant il peut ne pas se développer.

Ce groupe comprend 8 espèces dont les plus connues sont *P. melaninogenica* et *P. asaccharolytica*. Morphologiquement il s'agit souvent de coccobacilles à Gram (-), immobiles non sporulés.

Les principaux caractères d'identification de ces espèces sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU ff
CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES ESPÈCES PIGMENTÉES

	Esculine	Indole	Lipase	Catalase	Glucose	Maltose	Lactose	Cellobiose	Production ac. phénylacétique
<i>P.asaccharolytica</i>									
<i>P.gingivalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>P.intermedia</i>		+	+	-	+	+	-		
<i>P.corporis</i>					+	+	-		
<i>P.melaninogenica</i>					+	+	+		
<i>P.denticola</i>	+	-	-	-	+	+	+		
<i>B.loescheii</i>	v	-	v	-	+	+	+	+	
<i>B.macacae</i>		+		+	+	-	+	-	
<i>B.levii</i>			+	-	v	-	v		

v = variable, réaction faiblement positive

1. Caractères cultureux

Les colonies apparaissent très fines et seulement après 3 à 4 jours, on peut avoir une fluorescence en lumière UV. Puis elles grossissent, pigmentent et s'entourent d'un léger halo d'hémolyse.

2. *Pouvoir pathogène naturel*

Prises isolément, ces bactéries ne sont pas pathogènes ; mais leur présence potentialise la virulence des bactéries associées.

P. melaninogenica, *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. oris*, *P. buccae*, *P. intermedia* sont préférentiellement isolés de prélèvements bucco-dentaires ou pleuro-pulmonaires.

P. asaccharolytica, et *P. bivia* se rencontrent surtout dans les infections abdominales et génitales.

B - Espèces saccharolytiques et bile-sensibles

On distingue 3 groupes :

a/ Espèces fermentant les pentoses : *P. oris*, *P. buccae*, *P. zoogloformans*, isolées dans des infections dentaires et pulmonaires.

bl Espèces **ne** fermentant pas les pentoses : *P. oralis*, *P. buccalis*, *P. veroralis*.

cl Espèces saccharolytiques et protéolytiques ; *P. bivia*, *P. disions*.

Les caractères d'identification des principales espèces sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU IV
CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES ESPÈCES BILE - SENSIBLES NON PIGMENTÉES

	Glucose	Saccharose	Lactose	Arabinose	Xylose	Salicine	Pglucosidase	Esculine	Indole	Gélatinase
<i>P. oris</i>	+	+	+	v	+	+	-	+	-	v
<i>P. buccae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. zooglo-</i> <i>formans</i>	+	+	+	v	v	v		+	v	v
<i>P. oralis</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>P. buccalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
<i>P. veroralis</i>	+	+	+	-	-	-	v	+	-	
<i>P. bivia</i>	+	.	+	-	-	-	.	.	-	+
<i>P. disions</i>	+	-	-	-	-	-	.	-	.	+
<i>B. capillosus</i>	y	-	-	-	-	-		+	-	-
<i>P. heparinolytica</i>	+	+	+	v	+	+			+	-
<i>Foulora</i>	+	+	+	-	-	-		+	-	-
<i>P. nimiricola</i>	+	+	+	+	+	+		+	-	+

v = variable, réaction faible

C - *Bacteroides* non saccharolytiques

B. putredinis

Il peut être isolé dans des infections intestinales (appendicites) et n'exige pas de facteur de croissance.

B. ureolyticus (anc. *B. corrodens*)

Il présente un aspect typique en culture : colonies plates, brillantes, creusant le milieu de culture (confusion possible avec *Eikenella corrodens*)

Il possède peu de caractères positifs (ne fermente aucun sucre).

On l'isole dans des infections bucco-dentaires ou pleuro-pulmonaires.

B. pneumosintes

C'est un très petit bacille, les colonies ne sont visibles qu'à la loupe, la culture est lente. Il ne fermente aucun sucre et peut être isolé de prélèvements naso-pharyngés.

Les principaux caractères d'identification sont résumés dans le tableau V. Ils sont tous esculine (-).

TABLEAU
CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES ESPÈCES NON SACCHAROLYTIQUES

	Indole	Gélanase	Nitrate réductase	Uréase	Digestion du lait	Catalase
<i>Trppecuta</i>	-	+	v	-	-	
<i>B.putredinis</i>	+	+	-	-	+	+
<i>B.weolyticus</i>	-	v	+	+	v	
<i>B.gracilis</i>	-	-	+	-	-	
<i>D.nodosus</i>	-	+	-	-	+	
<i>B.pneumosintes</i>	-	-	-	-	-	
<i>B.coagulans</i>	+	+	-	-	+	-

v = variable, réaction faiblement positive

III - TRAITEMENT DES INFECTIONS A *BACTEROIDES* ET SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES

Le traitement d'une infection à anaérobies à Gram (-) repose sur 2 types d'action à mener conjointement.

A - Traitement local

D comprendra l'évacuation du pus (ponction, excision chirurgicale), l'excision des tissus nécrosés et l'exposition des tissus à l'oxygène de l'air ou en caisson hyperbare.

B - Traitement général : antibiothérapie

Les anaérobies sont constamment résistants aux aminosides, ces antibiotiques ne pouvant passer la membrane bactérienne.

Le problème est dominé par *Bacteroides fragilis* qui est l'espèce la plus courante et la plus résistante.

La pénicilline G, la plus anciennement utilisée dans les infection à anaérobies, est inefficace sur *B. fragilis* qui est résistant à de nombreuses bêta-lactamines grâce à une bêta-lactamase de type TEM. Les bêta-lactamines généralement efficaces sont : les uréidopénicillines, les associations avec un inhibiteur de bêta-lactamase, l'imipénème. Parmi les céphalosporines, le cefoxitine est le plus efficace ; les céphalosporines de 3^e génération ne sont pas plus actives, à l'exception du céfotétan.

Bacteroides fragilis est résistant aux tétracyclines dans 60 % des cas et aux macrolides dans 10 %. Cette résistance est d'origine plasmidique ou chromosomique.

Le chloramphénicol reste très efficace (très peu de souches de *B. fragilis* résistantes) et présente l'intérêt d'un bon passage dans le système nerveux central mais ses effets toxiques en limitent les indications.

La clindamycine offre les mêmes avantages et des inconvénients équivalents.

Le métronidazole a une action spécifiquement anti-anaérobie et on ne rencontre pratiquement pas de résistance chez *Bacteroides* pour cet antibiotique bien qu'il soit utilisé depuis longtemps. La constatation d'une souche résistante *in vitro* au métronidazole doit faire discuter l'identification.

Le métronidazole agirait comme métabolite spécifique de la voie fermentative en fonctionnant de façon irréversible et alternative comme accepteur terminal d'électrons dans une réaction de phosphorylation au niveau du substrat. Or la voie fermentative est capitale chez les anaérobies. On a montré que le métronidazole est réduit par la ferrédoxine ou par les processus métaboliques liés à la

ferrédoxine chez les bactéries anaérobies sensibles. Cette réduction est importante pour l'action antibactérienne :

- en diminuant la concentration intracellulaire du composé non réduit, créant un gradient qui permet l'entrée du métronidazole dans la cellule,
- en donnant naissance à des dérivés responsables de la destruction des bactéries sensibles.

En pratique pour traiter une infection à *B. fragilis*, on utilisera une bi-antibiothérapie dont l'un des antibiotiques sera le métronidazole et l'autre sera adapté d'après l'antibiogramme. Il faut toujours penser que ces infections sont souvent polymicrobiennes (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, bactéries anaérobies facultatives...), la pipéracilline représente alors un choix intéressant.

Les autres espèces de *Bacteroides* sont plus rarement productrices de bêta-lactamase que ne l'est *B. fragilis*, elles sont généralement sensibles aux pénicillines et aux céphalosporines.

GENRE FUSOBACTERIUM

Il s'agit de bacilles à Gram (-) anaérobies stricts, de taille très variable, non sporulés, parfois mobiles (ciliature péritriche) et caractérisés par un grand polymorphisme. Leur GC % varie entre 26 et 34 moles. Ils n'exigent pas d'hémine pour leur croissance.

Ils produisent une quantité importante de butyrate dont l'odeur est caractéristique.

Dix espèces sont décrites dans la dernière édition du Bergey's Manual :

F. gonidiaformans, *F. mortiferum*, *F. naviforme*, *F. necrogenes*, *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. perfoetens*, *F. prausnitzii*, *F. russii*, et *F. varium*.

Récemment de nouvelles espèces ont été décrites, elles sont présentes au niveau de la cavité buccale, ce sont : *F. periodonticum*, *F. alocis*, *F. suici* et *F. simiae*.

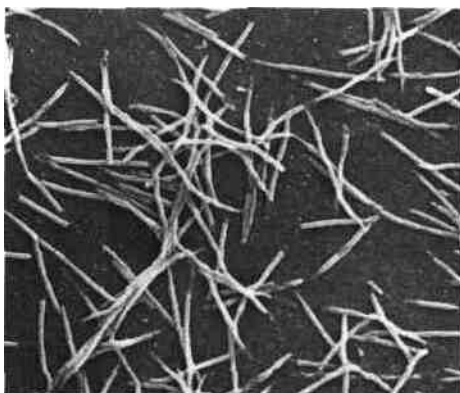
ï - *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*

Décrit en 1896 par Vincent dans une angine et l'ulcère phagédénique (en association avec des spirochètes). La culture est réalisée par Veillon et Zuber en 1898 (anciens noms : *Fusiformis fusiformis*, *Sphaerophorus fusiformis*).

A - Habitat

C'est une bactérie commensale de la cavité buccale et de l'appareil respiratoire, elle peut également être isolée dans le tractus digestif ou génital.

B - Morphologie



Ce sont des bacilles à Gram (-) aux extrémités effilées d'où un aspect en fuseau (navette) allongé, de taille très variable (2 µm à 10 µm de long).

Fusobacterium est susceptible de se transformer en forme filamenteuse avec des renflements terminaux ou médians pouvant aboutir à des sphéroplastes libres de 1 à 3 µm de diamètre. Des granulations métachromatiques peuvent être présentes. C'est une bactérie immobile.

C - Caractères cultureux

Il s'agit d'un germe anaérobie strict, mais certaines souches **peuvent tolérer** jusqu'à 6 % d'O₂ (microaérophiles).

Les souches pathogènes sont plus exigeantes que les souches saprophytes et sont sérophiles obligatoires. Les colonies peuvent se présenter sous 3 aspects : lisses, tachetées ou en chapelure. En bouillon on observe une formation de gros flocons (aspect en mie de pain). Cette espèce est peu ou pas gazogène.

D - Caractères biochimiques

L'attaque des hydrates de carbone est faible.

Les caractères importants sont les suivants :

- Gélatinase (-).
- Lait lentement coagulé.
- Indole (+).
- GLC : pic de butyrate.

E - Pouvoir pathogène naturel

Fusobacterium nucleatum est l'espèce la plus fréquemment isolée parmi les *Fusobacterium*.

Il est responsable de l'angine de Vincent qui est une ulcération d'une amygdale, recouverte d'un enduit grisâtre pseudo-membraneux. Le diagnostic bactériologique est évident après la coloration de Gram : présence d'une association fuso-spirillaire.

Ce germe est prédominant au niveau du tractus pulmonaire où il peut être à l'origine de pleurésies purulentes, d'abcès pulmonaires.

Dans des proportions plus faibles il est responsable d'infections variées :

- bucco-dentaires : stomatites, pulpites, cellulites dentaires,
- intestinales : abcès du foie, péritonites, colites,
- génitales,
- méningites, adénites,...

Comme pour les *Bacteroides*, on retiendra qu'un terrain particulier favorise la survenue des infections ou surinfections dues à ce germe.

Il n'y a pas de production de toxine ou d'hémolysine.

F - Diagnostic

Il sera évoqué d'après la morphologie et confirmé par l'étude des caractères biochimiques (voir tableau VI). Trois sous-espèces ont été décrites ne différant que par leur profil électrophorétique et leur GC%.

TABLEAU VI
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES
ESPÈCES DE *FUSOBACTERIUM*

	croissance sur bile 20%	esculine hydro- lysée	indole	glucose	fructose	mannose	lactose	maltose	siaccharose;	gaz
<i>F.alocis</i>		-			-	-
<i>F.gonidia-</i>										
<i>formons</i>	-		-	+	v	-	-	-	-	+
<i>F.monferum</i>	+		+	-	+	v	v	v	v	+
<i>F.naviforme</i>	-		-	+	-	-	-	-	-	+
<i>F.necrogenes</i>	faible	+	-	-	v	v	v	-	-	+
<i>F.necrophorum</i>	-		-	+	-	-	-	-	-	+
<i>F.nucleatum</i>	v		-	+	-	-	-	-	-	-
<i>F.perfoetens</i>	-		-	-	v	v	-	-	-	+
<i>F.periodon-</i> <i>nUCT</i>	-	-	+	+	+	-	-			v
<i>F.prausnitm</i>	-	+	-	v	v	-	v	v	-	-
<i>F.russii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F.sulci</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F.simiae</i>	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>F.varium</i>	faible	-	+	v	v	v	-	-	-	+

v = variable, réaction faible

II - *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*

Cette espèce a été décrite dans la littérature sous une trentaine de dénominations toutes synonymes : *Sphaerophorus necrophorus*, *Sphaerophorus funduliformis*, *Bâcleraides necrophorum*...

C'est un des rares anaérobies non sporulés dont le pouvoir pathogène est dû à des facteurs toxiques.

A - Habitat

Il se trouve dans les cavités naturelles : cavité buccale essentiellement, vagin.

B - Morphologie

C'est un bacille à Gram (-), immobile, très polymorphe : formes courtes ovoïdes à centre clair, formes longues filamenteuses avec des renflements, sphéroplastes.

Récemment a été décrit *F. pseudonecrophorum* qui diffère de *F. necrophorum* par l'absence de lipase et d'hémolyse bêta.

C - Caractères cultureux

C'est une bactérie anaérobie stricte. Le pH optimal de développement est légèrement basique (7,5-7,8).

Les colonies sont grises ou jaunes, convexes, de 2 à 3 mm de diamètre avec un centre surélevé (aspect d'œuf sur le plat) et parfois un petit halo d'hémolyse. Conjointement on note une odeur fétide.

En bouillon, la culture est floconneuse et très gazogène.
C'est une espèce non sérophile.

D - Caractères biochimiques

Les principaux caractères à prendre en considération sont :

- glucose, maltose, galactose (+),
- lactose, tréhalose, raffinose (+ ou -),
- indole (+),
- gélatinase (-),
- lait lentement coagulé,
- GLC : production importante de butyrate ; propionate et acétate étant également présents en quantités plus faibles.

E - Pouvoir pathogène naturel

F. necrophorum était responsable d'angine aiguë nécrotique suivie de septicémie grave d'évolution fatale avant la pénicilline. Il peut être aussi responsable d'infections gynécologiques, d'otites, de mastoïdites, d'abcès du cerveau, d'infections digestives : abcès hépatique, appendicite, péritonite, septicémie. Cependant ces infections sont plus rares actuellement depuis l'utilisation de la pénicilline.

L'association d'une angine et d'un infarctus pulmonaire dus à *F. necrophorum* constitue le syndrome de Lemierre.

F - Pouvoir pathogène expérimental

L'injection intra-veineuse au lapin ou au cobaye d'une culture de 48 h en milieu liquide entraîne une septicémie mortelle.

Le pouvoir pathogène serait dû à une hémolysine et à une hémagglutinine.

II' - AUTRES ESPÈCES DE *FUSOBACTERIUM*

A - *Fusobacterium mortiferum*

Anciennement dénommé *F. freundii* ou *Sphaerophorus mortiferus*, c'est un hôte de la cavité buccale et du tube digestif. Il est isolé dans de nombreuses suppurations intestinales, pleurésies etc...

Il fermente de nombreux sucres. Le diagnostic différentiel peut se poser avec certains *Bacteroides*, dans ce cas la chromatographie en phase gazeuse s'avère utile.

Il est caractérisé par sa résistance aux macrolides et à la rifampicine.

B - *Fusobacterium necrogenes*

Il peut être isolé dans les selles.

C - *Fusobacterium varium*

Il peut être isolé dans la cavité buccale, rarement considéré comme pathogène.

IV - TRAITEMENT ET SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DU GENRE *FUSOBACTERIUM*

Dans les septicémies, le traitement chirurgical visant à supprimer la porte d'entrée est indispensable.

Globalement les espèces du genre *Fusobacterium* sont caractérisées par leur grande sensibilité aux bêta-lactamines, aux macrolides, au chloramphénicol et aux antibiotiques habituellement actifs sur les anaérobies. Toutefois, des souches possédant une bêta-lactamase peuvent être isolées.

GENRE LEPTOTRICHIA

Il fut décrit en 1879 par Trevisan. Ce genre a longtemps été confondu avec *Fusobacterium nucleatum*.

i - CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Ce sont des bacilles droits ou peu incurvés de 5 à 15 µm sur 1 (µm avec des extrémités effilées ou arrondies, immobiles. On peut trouver quelques formes filamenteuses et/ou des sphéropastes.

GC % = 34.

GLC : pic prédominant d'acide lactique, production faible d'acide acétique, jamais de production d'acide butyrique.

Une seule espèce est reconnue : *Leptotrichia buccalis*.

II - HABITAT - ÉPIDÉMIOLOGIE

C'est **un germe** commensal de la bouche, parfois isolé du tractus digestif ou vaginal.

Il peut se rencontrer comme pathogène opportuniste chez les immunodéprimés.

III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES-IDENTIFICATION

A - Caractères cultureux

Les colonies n'apparaissent qu'après 4 à 5 jours d'étuve, conjointement à un dégagement gazeux putride.

Ces colonies sont irrégulières (forme de méduse).

B - Caractères biochimiques

Glucose (+), lactose (+), saccharose (+), maltose (+), raffinose (+).

Indole (-), H₂S (-), catalase (-), nitrate reductase (-), gélatinase (-), mannitol (-).

C - Diagnostic différentiel

D peut se poser avec *F. nucleatum*.

	indole	butyrate	glucides
<i>F. nucleatum</i>	+	+	Fermentation faible, pas de gaz
<i>L. buccalis</i>			Fermentation +++, avec gaz

D - Traitement

Ce germe est sensible aux bêta-lactamines, aux macrolides, au chloramphénicol.

BIBLIOGRAPHIE

FINEGOLD S.M., EDELSTEIN M.A.C., « Gram négative, non sporeforming anaerobic bacilli », in *Manual of Clinical Microbiology*, 4th Ed. E.H. Lennette, Washington, 1985, 450-460.

FINEGOLD S.M., « Treatment of Anaerobic Infections : an overview », *Scand. J. Infect. Dis.*, 1984, Suppl. **46**, 89-95.

HOLDEMAN L.V., CATO E.P., W.E.C. MOORE eds. , *Anaerobic Laboratory Manual*, 4th Ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977, Blackburg.

LAFAX Ch. « Infections par les bactéries anaérobies non sporulées », Roche Ed. 1981.

PRIVITERA G., ORTISI G., « Anaérobies : résistance acquise », in *L'Antibiogramme*, MPC Vidéom, Paris 1985, 139-143.

SEBALD A., « *Bacteroides* » et « *Fusobacterium* », in *Bactériologie Médicale*, L. Le Minor et M. Verou, Ed. Flammarion Médecine Science, Paris, 1990, 744-749 et 750-763.

SHAH H.N., COLLINS M.D., « Proposai for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas* », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, **38**, 128-131.

SHAH H.N., COLLINS D.M., « *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninigenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides* », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1990, **40**, 205-208.

WILLIS A.T., « Host factors predisposing to anaerobic infections », *Scand. J. Infect. Dis.*, 1984, Suppl. **46**, 18-26.

Chapitre XXXII

BACTÉRIES DES VAGINOSES

I - GÉNÉRALITÉS SUR LES VAGINOSES

Les vaginoses ou vaginites non spécifiques sont des infections fréquentes, caractérisées par des leucorrhées et dues à d'autres agents que *Candida*, *Trichomonas*, *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis*.

Cette affection traduit un déséquilibre de la flore vaginale. Les lactobacilles formant la flore normale du vagin (flore de Döderlein) ont disparu et sont remplacés par une flore abondante au sein de laquelle vont être isolés :

- *Gardnerella vaginalis*
- *Mobiluncus spp*
- des anaérobies (*Prevotella bivia*, *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella...*)

Le diagnostic de vaginose se fera sur les critères suivants :

1. Aspect clinique

Présence de leucorrhées blanchâtres, adhérentes, homogènes, parfois malodorantes. Elles ne sont accompagnées souvent d'aucune gêne fonctionnelle, si ce n'est un inconfort. Cependant cette infection favorise la survenue de complications avec prurit, cervicite, inflammation vaginale voire infections génitales hautes en particulier au cours de la grossesse.

2. Test à la potasse

L'addition de potasse à 10 % aux sécrétions vaginales provoque le dégagement d'une odeur de poisson pourri sans doute liée à la libération d'aminés (putrescine et cadavérine), produits du catabolisme de la lysine et de l'omithine.

3. Un pH vaginal supérieur à 4,5'

4. A l'examen direct absence de polynucléaires sauf en cas de complication inflammatoire ou infectieuse.

5. A la coloration de Gram disparition ou diminution des lactobacilles qui sont remplacés par une flore monomorphe (*Gardnerella*) ou polymorphe (anaérobies).

La présence de bactéries "en virgule" permet le diagnostic d'infection à *Mobiluncus*.

6. La présence de « clue-cells » est un excellent critère diagnostique de l'infection à *Gardnerella* : ce sont des cellules épithéliales recouvertes de très nombreux petits bacilles de forme et de taille régulières qui adhèrent à la surface des cellules. Cet aspect est observé après coloration de Gram (les bacilles sont alors à Gram variable) mais également sur les frottis cytologiques.

En pratique l'examen direct permet le diagnostic de vaginose et la mise en culture des bactéries en cause, difficile et coûteuse, ne fournit qu'une réponse tardive.

Le traitement de ces épisodes consiste généralement en l'administration de métronidazole, *per os* ou localement (ovules gynécologiques).

Nous décrivons ci-dessous les caractéristiques des deux principaux **genres en cause** dans les vaginoses : *Gardnerella* et *Mobiluncus* souvent associés.

II - GARDNERELLA

A - Historique

En 1955, Gardner et Dukes ont montré le rôle dans les vaginites non spécifiques d'un bacille qui fut successivement appelé *Haemophilus vaginalis* puis *Corynebacterium vaginale*. En 1980, à la suite de travaux taxonomiques montrant que ce bacille ne pouvait être rattaché à l'un ou l'autre de ces deux genres, le nom de *Gardnerella vaginalis* a été adopté.

B - Habitat et pouvoir pathogène

G. vaginalis peut être isolé dans les voies génitales de la femme en l'absence de toute symptomatologie. La fréquence du portage est plus élevée chez les femmes ayant une forte activité sexuelle.

Le rôle pathogène de *G. vaginalis* a été discuté. Néanmoins, il est certain que cette espèce bactérienne joue un rôle important dans le développement des vaginoses. La prolifération concomitante d'un anaérobie favorise celle de *G. vaginalis*.

Chez l'homme, *G. vaginalis* est trouvé dans l'urètre de la plupart des partenaires de femmes infectées. Il s'agit en général d'un portage asymptomatique.

C - Caractères bactériologiques

J. Morphologie

G. vaginalis est un petit bacille à Gram variable, immobile. Sa longueur moyenne est de 1 à 2 μm , parfois coccobacillaire. Les corps bactériens peuvent s'associer par paires ou en palissades à la manière des corynébactéries.

2. Caractères culturels

La culture de *G. vaginalis* est délicate. Après ensemencement sur milieu riche, des colonies se développent en 48 à 72 heures à 37°C dans une atmosphère de 5 à 10 % de CO_2 .

- milieux de culture non sélectifs : ils sont constitués d'une base riche (Columbia) additionnée de 5 % de sang. Sur gélose au sang humain, les petites colonies gris-bleu sont entourées d'une zone d'hémolyse P à bord flou qui ne s'observe pas avec le sang de mouton ou le sang de cheval,
- milieu de culture sélectif est obtenu par addition de colistine, de gentamicine ou d'acide nalidixique,

3. Identification

Les colonies suspectes sont identifiées par les tests suivants :

- hémolyse du sang humain,
- absence de catalase et d'oxydase,
- hydrolyse de l'hippurate et de l'amidon,
- attaque du glucose, du maltose mais pas du mannitol,
- sensibilité au métronidazole à forte concentration (disque 50 u.g), **et au triméthoprime,**
- résistance aux sulfamides et à l'optochine.

La galerie API-Strept permet l'identification de *G. vaginalis*.

III - MOBILUNCUS

A - Historique

Le genre *Mobiluncus* a été proposé en 1984 pour désigner des bactéries qui sont mobiles et incurvées (*uncus*). Dès 1985, des bactéries ayant la morphologie des vibrions avaient été observées dans des sécrétions vaginales. En 1940, Prévost avait nommé *Vibrio mulieris* le vibrion isolé par Curtis en 1913. En 1980, Durieux et Dublanche isolaient par culture des « vibrions anaérobies » dans 11 % des leucorrhées examinées, soulignant ainsi l'importance de ces bactéries dans les vaginites non spécifiques.

B - Habitat et pouvoir pathogène

Mobiluncus peut être isolé en petite quantité chez des porteurs sains. Lors des vaginoses la concentration de *Mobiluncus* dans les sécrétions vaginales est élevée.

C - Caractères bactériologiques

7. Morphologie et mobilité

Les *Mobiluncus* sont des bacilles de 1 à 3 u.m de long, incurvés en coup d'ongle et à Gram variable. Sur les frottis, ils apparaissent souvent à Gram négatif, mais la structure de leur paroi est proche de celle des bacilles à Gram positif dont ils sont à rapprocher taxonomiquement.

Ils sont mobiles, grâce à un ou plusieurs cils polaires ou parapolaires.

2. Caractères culturaux

Ce sont des bacilles anaérobies stricts. Ils se développent sur gélose Columbia enrichie de 2,5 à 5 % de sang. Le milieu peut être rendu sélectif par addition de 15 µg/ml d'acide nalidixique et de 10 µg/ml de colistine. Les colonies se développent après 48 à 72 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose.

3. Caractères d'identification

Les *Mobiluncus* ne possèdent ni catalase ni oxydase. Deux espèces sont décrites :

- *M. curtisii*. Les corps bactériens sont courts (1,7 u.m de long). Cette espèce hydrolyse l'hippurate, est faiblement glucidolytique et résiste au métronidazole. Il existe deux sous-espèces : *M. curtisii* subsp. *curtisii* qui est nitrate-réductase négative et *M. curtisii* subsp. *holmesii* qui est nitrate réductase positive.
- *M. mulieris*. Les corps bactériens atteignent 3 u.m de long. Cette espèce n'hydrolyse pas l'hippurate et est fortement glucidolytique.

4. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité au métronidazole est irrégulière. Toutes les souches sont sensibles à la pénicilline, l'ampicilline, la céfoxitine, l'érythromycine et, paradoxalement pour un anaérobie, à la gentamicine.

BIBLIOGRAPHIE

- CARLONE G. M., THOMAS M. L., ARKO R.J., *et al.*, « Cell wall characteristics of *Mobiluncus* species », *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, **36**, 288-296.
- DURIEUX R., DUBLANCHET A., « Les vibrions anaérobies des leucorrhées », *Méd. Mal. Infect.*, 1980, **10**, 109-115.
- LOSSICK J. G., « *Gardnerella vaginalis*, associated leukorrhea : the disease and its treatment », *Rev. Infect. Dis.*, 1982, 5793-5799.
- NUGENT R.P., KROHN M.A., HILLIER S.L., « Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram strain interpretation. » *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 297-301.
- PIOT P., VAN DYCK E., « Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis* », *Scand. J. Infect. Dis.*, Suppl. **40**, 1983, 15-18.
- SPIEGEL C. A., AMSEL R., HOLMES K. K., « Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid », *J. Clin. Microbiol.*, 1983, **18**, 170-177.
- SPIEGEL C. A., ESCHENBACH D. A., AMSEL F. *et al.*, « Curved anaerobic bacteria in bacterial (non spécifique) vaginosis and their response to antimicrobial therapy », *J. Infect. Dis.*, 1983, **148**, 817-822.
- WEBER P., BOUSSOUGANT Y., « La vaginite non spécifique ou vaginose bactérienne », *Technique et biologie*, 1986,**1**,15-19.

SECTION Vm — MYCOBACTERIES

GENERALITES SUR LES MYCOBACTERIES

Il s'agit de bactéries appartenant à la famille des *Mycobacteriaceae* qui ne renferme qu'un seul genre : le genre *Mycobacterium* subdivisé actuellement en 54 espèces.

Étymologiquement, « *Mycobacterium* » signifie « bâtonnet-champignon », car ces bactéries peuvent former des extensions filamenteuses présentant parfois des branchements courts. Ces hyphes peuvent être à la surface du milieu de culture, aériennes ou rhizoïdes. Ces formes filamenteuses ramifiées sont rares et une faible perturbation suffit à les fragmenter en formes bacillaires ou coccoïdes.

Il ne s'agit pas de champignons, mais de bactéries, car ces organismes :

- n'ont pas de membrane nucléaire,
- sont sensibles au lysozyme,
- ont une paroi dont la composition chimique est de type bactérien,
- sont sensibles à des agents antibactériens.

Ces bactéries sont dites **acido-alcoolo-résistantes**, c'est-à-dire qu'une fois colorées par la fuchsine ou par un fluorochrome comme l'auramine ou la rhodamine, elles ne sont décolorables ni par les acides, ni par l'alcool. Il s'agit donc d'une propriété tinctoriale qui est la base de la coloration de Ziehl-Neelsen. Cette caractéristique des Mycobactéries donne à l'examen microscopique toute son importance. Cependant, cette propriété est perdue à certaines étapes de la croissance par une proportion variable des corps bactériens. Par exemple, une culture de Mycobactéries à croissance rapide ne contient que 10 % de bacilles acido-alcoolo-résistants.

Les formes jeunes de *M. tuberculosis* ne sont pas acido-alcoolo-résistantes, mais les formes matures le deviennent. L'acido-alcoolo-résistance peut disparaître sous l'action de plusieurs antibiotiques : INH, éthionamide, pénicilline.

Au Gram ces bactéries sont très peu colorées.

Elles sont immobiles, non sporulées et sans capsule ; leur métabolisme est aérobic strict. **Leur** croissance est lente ou très lente (2 jours à 8 semaines) et leur température optimale de croissance est variable selon les espèces ; ces germes synthétisent souvent des pigments caroténoïdes (jaune, orangé ou rosé) et contiennent beaucoup de lipides dans la composition desquels entrent des acides gras hydroxylés et ramifiés de 60 à 90 atomes de carbone appelés acides mycoliques.

Chapitre XXXIII

BACILLES DE LA TUBERCULOSE

Parmi les nombreuses espèces de Mycobactéries, trois sont responsables de la tuberculose humaine. A côté de *M. tuberculosis*, la plus fréquente, il existe des cas dus à *M. bovis* ou à *M. africanum*.

HISTORIQUE

- 1865 : Villemin montre que la tuberculose humaine est transmissible **par** inoculation au lapin et au cobaye.
- 1882** : Découverte du bacille de **Koch** (actuellement nommé *M. tuberculosis*), culture sur sérum de boeuf coagulé.
- 1889** : Découverte du bacille de la tuberculose aviaire.
- 1902** : Dorset met au point un milieu de culture à l'oeuf qui **sera amélioré** par divers auteurs (Lôwenstein, Jensen, Coletsos, Petraghani).
- 1902 : Découverte de *M. bovis*, agent de la tuberculose bovine.
- 1921 : Calmette et Guérin obtiennent un vaccin, le bacille de Calmette et Guérin (B.C.G.), après 13 ans de subculture d'une souche pathogène de *M. bovis* sur pomme de terre biliée glycinée.
- 1944 : Waksman découvre la streptomycine.
- Années 1950 : Découverte du rôle pathogène éventuel d'autres Mycobactéries « non tuberculeuses » dites atypiques.
- 1968** : Description de *M. africanum*.

1 - MORPHOLOGIE

A - Microscopie optique

D s'agit d'un bacille de 2 à 5 μm de long et de 0,3 μm de large, rectiligne ou plus ou moins incurvé, aux extrémités arrondies et immobile. Ce bacille est non capsulé, non sporulé.

- Dans les produits pathologiques il se présente sous forme isolée ou en petits amas.
- En culture on peut observer des formes coccoïdes ou filamenteuses.
- A la coloration :

1. II s'agit de bacilles difficilement colorables par les colorants usuels.

2. Les colorations de Ziehl-Neelsen et à l'auramine sont spécifiques des mycobactéries. Ces dernières contiennent dans leur paroi des acides mycoliques qui

sont des structures lipidiques responsables de la propriété « d'acido-alcool-résistance » des bactéries.

- Dans le cas de la coloration de Ziehl-Neelsen, le colorant utilisé est de la fuchsine phéniquée ; les mycobactéries apparaissent en rosé sur fond bleu en microscopie à immersion.
- Dans le cas de la coloration à l'auramine 0, les bacilles colorés ont une teinte vert-jaune en microscopie à fluorescence après excitation à 434 nm.

B - Microscopie électronique

La structure de la bactérie est semblable à celle des autres bactéries ; chez les bactéries quiescentes on trouve des granulations de polyphosphates et de poly-P-hydroxybutyrate. L'ADN des bactéries en croissance est associé à des mésosomes.

II - CARACTÈRES CULTURAUX DES BACILLES DE LA TUBERCULOSE

- Il s'agit de germes **aérobies stricts**, parfois microaérophiles (*M. bovis* ou *M. africanum*) et s'enfonçant alors dans le milieu de culture.

La culture est lente (3 à 4 semaines pour *M. tuberculosis*, 45 à 60 jours pour *M. africanum* et *M. bovis*) ; le temps de génération est d'environ 20 h sur les milieux de culture. La croissance est plus lente pour certaines souches, particulièrement pour celles résistant à l'INH (hydrazide de l'acide isonicotinique).

- Ce sont des colonies habituellement R (eugéniques), en chou-fleur, de couleur crème pour *M. tuberculosis* ou S (dysgoniques) pour *M. bovis* et *M. africanum*.

L'aspect des colonies R est dû à la présence de bactéries groupées en cordes qui diffractent ainsi la lumière et rendent la colonie opaque. Au contraire, les colonies S (lisses) ont une texture homogène, permettant le passage de la lumière ; de ce fait ces colonies sont translucides.

Température optimum de croissance : 35 à 37°C.

pH optimum : 6,8 à 7,0.

De l'humidité est nécessaire à la culture ainsi que du CO₂ (5 à 10 %) sur les milieux géloses.

Besoins nutritifs :

- Source d'azote : asparagine ou acide glutamique.
- Source de carbone : glycérol (0,75 %) pour *M. tuberculosis*.
pyruvate sodique (0,48 %) pour *M. bovis*.
- Sels (phosphates, potassium, magnésium, citrate de fer)

Les acides gras du milieu de culture ont une action inhibitrice sur la croissance bactérienne. Cette action peut être levée en diluant l'inoculum dans une solution d'albumine.

A - Milieux solides à l'oeuf coagulé

Ils contiennent du vert malachite à 0,025 % pour inhiber la croissance des germes contaminants. Pour des échantillons très contaminés on peut les employer additionnés d'antibiotiques (ac. nalidixique et pénicilline G). En France, les plus utilisés de ces milieux sont le milieu de Jensen (ou Lowenstem-Jensen) et celui de Coletsos. Ils sont tous opaques.

1. Le milieu de Lôwenstein-Jensen est le milieu de référence pour la détermination de la nature eugonique ou dysgonique des colonies :

M. tuberculosis forme des colonies rough (R) (eugoniques) rugueuses, friables, en chou-fleur, opaques, difficiles à émulsionner, beige-crème et se détachant facilement du milieu de culture.

M. bovis forme des colonies smooth (S) (dysgoniques), petites et faciles à émulsionner.

M. africanum est le plus souvent dysgonique avec un centre acuminé.

Ces deux dernières espèces poussent mieux sur ce milieu additionné de pyruvate.

2. Le milieu de Coletso donne souvent des colonies plus volumineuses que le milieu de Jensen. *M. bovis* y pousse plus facilement car ce milieu contient du pyruvate en plus du glycérol.

On décrit trois types de milieux de Coletso :

- celui à 4 % de gélatine pour bactéries aérobies et en « bon état »,
- celui à 20 % de gélatine pour les bactéries plutôt microaérophiles,
- celui additionné de pulpe d'organes de singe.

Seuls les deux premiers sont utilisés actuellement.

L'avantage des milieux à l'oeuf est leur sensibilité, l'aspect caractéristique des colonies et leur faible prix de revient.

Leur inconvénient est leur qualité variable et leur opacité qui ne permet pas d'observer précocement l'apparition de colonies.

B - Milieux solides géloses (Milieux de Middlebrook et Cohn : 7H10 et 7H11).

Ce sont des milieux transparents qui doivent être incubés sous 5 à 10 % de CO₂ dans des sacs plastiques pour conserver l'humidité.

Avantages : leur transparence permet d'observer précocement, par microscopie au faible grossissement, l'apparition de colonies de mycobactéries ainsi que leur morphologie ; ceci est utile dans le cas de mélange de mycobactéries.

Inconvénients : ces milieux se contaminent facilement et donnent un moins grand nombre de résultats positifs que les milieux à l'oeuf. En outre leur prix de revient est élevé.

Pour la croissance de *M. bovis* on peut aussi enrichir ces milieux en pyruvate.

C - Milieux liquides

1. Milieu de Sauton (sels minéraux, asparagine, glycérine)

M. tuberculosis croît en 8 à 10 jours sous forme de voile.

Ce milieu est utilisé pour le repiquage des souches de B.C.G.

2. Milieu de Dubos et milieu de Youmans

Les bactéries se déposent au fond du tube

3. Milieu 7H9 (dérivé du milieu de Dubos)

III - CARACTÈRES D'IDENTIFICATION

A - Caractères biochimiques

1. Production d'acide nicotinique (niacin-test)

M. tuberculosis libère de l'acide nicotinique dans le milieu de culture, sans l'utiliser (99 % souches) (test effectué après 28 jours de culture). *M. bovis* et le B.C.G. n'en libèrent pas. *M. africanum* peut en produire plus ou moins précocement ou pas du tout.

Cette recherche s'effectue entre le 28^e et le 42^e jour de culture.

2. Réduction des nitrates en nitrites (technique de Virtanen)

Ce test s'effectue sur une culture âgée de 3 à 4 semaines.

M. tuberculosis est nitrate (+),

M. bovis est nitrate (-),

M. africanum est nitrate variable selon les techniques utilisées et selon les biotypes.

3. Catalase

Toutes les mycobactéries possèdent une catalase, sauf les souches de *M. tuberculosis* et de *M. bovis* résistant à plus de 10 u.g/ml d'INH.

Propriété fondamentale : cette catalase est détruite par chauffage à 68°C, à pH 7 et pendant 20 minutes chez *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* et le B.C.G., ainsi que chez 3 espèces de mycobactéries non tuberculeuses : *M. gastri*, *M. haemophilum*, *M. malmoense* (parfois *M. chelonae* et *M. avium-intracellulare*). Toutes les autres mycobactéries ont une catalase thermostable.

4. Amidases

M. tuberculosis hydrolyse l'urée, la pyrazinamide et la nicotinamide.

M. bovis n'hydrolyse que l'urée.

5. 13-glucosidase et lipase

Ces activités enzymatiques existent chez *M. tuberculosis*, mais pas chez *M. bovis*.

B - Sensibilité à des substances agissant sur le métabolisme de ces bactéries

1. L'hydrazide de l'acide thiophène 2-carboxylique ou TCH à 2 µg/ml

Toutes les mycobactéries y sont résistantes (moins de 1 % de **survivants**), y compris *M. tuberculosis*. Seul *M. bovis* et le B.C.G. y sont sensibles.

M. africanum y est sensible ou résistant.

Il est à noter que la résistance à l'INH détermine une résistance croisée au TCH chez *M. bovis*.

2. La thioacétazone ou thiosemicarbazone Tb] à 10 fJg/ml

M. tuberculosis et *M. bovis* sont sensibles à 10 µg/ml de Tbi alors que la plupart des mycobactéries non tuberculeuses (sauf *M. kansasii*, *M. scrofulaceum* et *M. gastri*) y sont résistantes.

M. africanum peut y être sensible ou résistant.

3. *La pyraz.inam.ide*

M. tuberculosis et *M. africanum* y sont sensibles et *M. bovis* résistant.

IV - SENSIBILITÉ AUX AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

A - Agents physiques

- Température : Ces germes sont sensibles à la chaleur et cette propriété est utilisée lors de la pasteurisation du lait pour détruire *M. bovis* (63°C pendant 30 mn).

Par contre ces bactéries résistent à + 4°C.

- Lumière : les bacilles tuberculeux sont sensibles aux rayons ultra-violets.
- Dessiccation : ils résistent aussi à la dessiccation et restent virulents dans les gouttelettes de Pflügge desséchées.

La lyophilisation permet la conservation des souches.

B - Agents chimiques

1. pH

Les acides et bases détruisent les mycobactéries, mais moins vite que les germes banals. Cette propriété est mise à profit pour décontaminer certains prélèvements (crachats, urines) tout en conservant la viabilité des mycobactéries.

2. Alcool isopropylique ou éthylique

Ces alcools détruisent les germes de la tuberculose en quelques minutes ; ils **sont** utilisables sur la peau.

3. Mélanges savon-phénol utilisant l'*o*-phénylphénol

Les mycobactéries sont tuées en 10 à 30 mn. L'action résiduelle est de 2 à 3 jours. Ces produits sont utilisables sur la peau.

4. L'hypochlorite de Na

Il est efficace dilué au 1/200^e avec 10 à 30 mn de contact, mais il n'a pas d'action résiduelle.

5. Le formaldéhyde 3-8 %, le glutaraldéhyde alcalin à 2 % et le phénol à 5% sont aussi actifs.

6. Les ammoniums quaternaires n'ont pas d'action sur les mycobactéries.

Cette propriété est mise à profit dans certains protocoles de décontamination des prélèvements biologiques.

V - CONSTITUTION CHIMIQUE

Les mycobactéries sont les bactéries les plus riches en lipides extractibles : 20 à 45 % du poids sec de la bactérie. Leur structure de base est un peptidoglycane lié de manière covalente à un mycolate d'arabinogalactane.

1. Peptidoglycane

Sa composition est analogue à celle du peptidoglycane des autres bactéries.

2. Arabinogalactane

Ce polyoside est caractéristique des bactéries des genres *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*.

C'est un haptène.

3. Acides mycoliques

Ce sont des acides gras ramifiés et hydroxylés formés de 60 à 90 atomes de carbone.

Ces acides mycoliques sont responsables de l'acido-alcool-résistance des mycobactéries.

4. Mycolate d'arabinogalactane

Le lipopolysaccharide des bacilles à Gram (-) est remplacé par le mycolate d'arabinogalactane.

5. Mycosides

Ce sont des glycolipides et des peptidoglycolipides ayant en commun un saccharide terminal contenant du rhamnose 0-méthylé.

Ils sont associés à la paroi des mycobactéries et sont spécifiques de certaines souches :

- type A : souches de mycobactéries non tuberculeuses **potentiellement virulentes** (*M. kansasii*) et de *M. tuberculosis* de virulence atténuée.
- type B : souches *M. bovis*.
- type C : souches aviaires ou saprophytes.

6. Le « cord-factor » (formé d'acide mycolique, de tréhalose, dimycolate de tréhalose)

Il est responsable de la formation de « cordes serpentes » chez *M. tuberculosis* en milieu liquide de Youmans : il s'agit d'amas de bacilles groupés en cordes à la coloration de Ziehl.

La présence de ces formations est corrélée à la virulence des bacilles tuberculeux.

Le cord-factor n'entraîne pas d'immunité antituberculeuse après injection.

7. Cires

Ce sont des éléments de paroi extractibles par l'alcool-éther. Selon leurs propriétés physico-chimiques on en distingue 4 types : A, B, C et D. Les souches virulentes possèdent 6 à 8 % de cires D ; ces dernières peuvent remplacer les mycobactéries dans l'adjuvant complet de Freund qui est utilisé comme un facteur adjuvant de l'immunité humorale chez l'animal.

Topologiquement, la paroi bactérienne est formée, de l'intérieur vers l'extérieur, de la membrane cytoplasmique, du peptidoglycane, du polymère d'arabinogalactane et d'acides mycoliques mêlés au dimycolate de tréhalose.

8. Protéines

Elles sont le **support de l'activité tuberculinique** et sont extraites **du corps bactérien** ou du filtrat de culture. Trois types de préparation les contiennent :

- la vieille tuberculine de Koch qui est un ultrafiltrat de culture concentré formé de protéines, de polyosides et d'acides nucléiques,
- la tuberculine de type IP 48, formée de glucides et de protéines,
- le PPD = « Purified Protein Derivative » de Seibert formé uniquement de protéines et qui sert d'étalon de référence international (= RT 23).

Ces protéines injectées par voie intra-dermique permettent de vérifier si un sujet a été au contact de *M. tuberculosis* ou de *M. bovis* :

- si le sujet n'a jamais été tuberculisé, on n'obtiendra pas de réaction **locale** (**ni** infiltration cutanée, ni rougeur, ni papule),
- si le sujet a été tuberculisé, ces protéines provoqueront une réaction locale d'hypersensibilité retardée (HSR). Cette réaction est identique avec les différentes mycobactéries de la tuberculose. Il existe des réactions croisées avec des protéines analogues extraites d'autres mycobactéries et appelées sensitines.

VI - GÉNÉTIQUE DE *M. TUBERCULOSIS*

A - Mutants résistants aux antibiotiques

1. Mécanisme de résistance

La résistance est due à des mutations chromosomiques ; aucun transfert de matériel génétique conduisant à une résistance n'a pu être mis en évidence.

Taux de mutation de résistance :

Streptomycine : 4.10^{n5}

Isoniazide ou hydrazide de l'acide isonicotinique (I.N.H.) : 5.10^{-6}

Rifampicine : 1.10^{n6}

2. Caractères des mutants INH-résistants :

a/ La résistance à 0,1 ou 0,2 jig INH/ml est liée à :

- **la** résistance à de fortes concentrations d'éthionamide,
- la persistance de l'activité catalasique,
- la persistance de la virulence pour le cobaye.

bl La résistance ai à 0 f X g INH/ml est liée à :

- **la** persistance de la sensibilité à l'éthionamide,
- la perte ou la diminution importante de l'activité catalasique,
- une grande diminution de la virulence pour le cobaye.

3. Caractères des mutants éthionamide-résistants :

al Certains résistent au Tb]

bl D'autres restent sensibles au Tb, mais résistent à de faibles concentrations d'INH (0,1-0,2 µg/ml).

B - Variations génétiques de *M. tuberculosis*

- Hongrie : colonies vertes sur milieu de Lôwenstein-Jensen, sensibles au TCH.
- Asie : colonies dysgoniques.
- Sud de l'Inde, Madagascar : 30 % de souches ont une activité catalasique faible et une virulence pour le cobaye diminuée et sont très résistantes à l'INH et au Tbi.
- *B.C.G.* : variant de *M. bovis*.

C - Existence de nombreux mycobactériophages

12 bactériophages permettent de distinguer 5 lysotypes : 3 types principaux (A, B et C) et 2 types secondaires (A_x et A₂).

Il existe des différences géographiques dans les lysotypes.

VII - POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME

L'homme est très sensible à l'infection tuberculeuse, mais seuls 3 à 5 % des sujets infectés développeront une tuberculose pulmonaire ; ce pourcentage augmente chez les sujets stressés ou vivant dans un environnement confiné.

La tuberculose est une maladie encore très répandue ; 7 millions de sujets sont contagieux dans le monde, dont les 3/4 dans des pays en voie de développement. Chaque année 3,5 millions de cas contagieux nouveaux sont recensés et le nombre de personnes infectées chaque année est estimé de 5 à 8 millions. Environ 2 à 3 millions de personnes meurent encore de tuberculose chaque année.

Incidence

La fréquence annuelle des nouveaux cas de tuberculose - maladie (= incidence) varie selon les pays :

- 300 à 500 cas pour 10⁵ habitants dans certains pays d'Asie, ou d'Océanie,
- 250 cas pour 10⁵ habitants en Afrique,
- 25 cas pour 10⁵ habitants en France (1987),
- moins de 20 cas pour 10⁵ habitants en Australie, Canada, Danemark, **U.S.A.**, Pays-Bas.

Mortalité

Elle diminue régulièrement partout.

En France : en 1910 : 288 pour 10⁵ habitants ; en 1950 : 58 pour 10⁵ habitants et en 1974 : 6 pour 10⁵ habitants

Taux annuel d'infection : Pourcentage de population positivant sa réaction cutanée à la tuberculine chaque année :

- 1975 : 0,1 % en France,
- 0,01 % aux Pays-Bas,
- environ 2 % dans les pays en voie de développement.

Dans les pays industrialisés ce taux diminue de 10 à 11 % chaque année depuis 1950 mais il est constant dans les pays en voie de développement. La chute de l'incidence observée dans les pays développés résulte principalement de l'amélioration des conditions de vie, de la pasteurisation du lait, du diagnostic précoce, du traitement des malades et de la chimiothérapie des sujets contacts.

Actuellement en France, 99 % des tuberculoses humaines sont dues à *M. tuberculosis* et 1 % à *M. bovis*. Quant à *M. africanum*, il peut être rencontré en Afrique de l'Ouest essentiellement.

A - La tuberculose primaire

Elle développe successivement : un chancre d'inoculation, des adénopathies et éventuellement une dissémination hématogène des bacilles dans tous les organes.

1. Le chancre d'inoculation

Les bacilles inhalés (cas le plus fréquent) arrivent préférentiellement dans le lobe moyen ou le lobe inférieur droit et se déposent au niveau de l'alvéole, juste sous la plèvre. Il se produit alors une réaction inflammatoire locale aspécifique : les macrophages alvéolaires phagocytent les bacilles tuberculeux ; ceux-ci poursuivent leur multiplication dans la cellule et la détruisent ; ils sont ainsi libérés, repris par d'autres macrophages et le cycle recommence. Ce chancre d'inoculation réalise donc une alvéolite.

2. Les adénopathies

Les bacilles diffusent de ce foyer primaire vers les ganglions loco-régionaux, c'est-à-dire les ganglions trachéo-bronchiques, et s'y multiplient, créant des adénopathies. L'infection se propage aux autres ganglions par voie lymphogène. Parallèlement se développe la réaction d'immunité cellulaire afin de tenter de limiter la dissémination hématogène du germe.

3. Dissémination hématogène des bacilles dans tout l'organisme

Par les lymphatiques efférents les bactéries peuvent gagner la circulation générale et parvenir à tous les organes.

B - Évolution de la tuberculose primaire

1. Guérison

C'est le cas le plus fréquent (95 % des cas), car durant les différentes phases de la tuberculose primaire le sujet développe une hypersensibilité à la tuberculine (4 à 12 semaines). Cette hypersensibilité s'accompagne d'une stimulation de l'immunité cellulaire par augmentation de l'efficacité des macrophages vis-à-vis des bacilles tuberculeux. On observe alors histologiquement la formation du follicule tuberculeux autour de la lésion d'alvéolite : les macrophages se différencient en cellules épithélioïdes et en cellules multinucléées géantes dites de « Langhans » qui se disposent en follicules autour de la lésion qui se caséifie. Le groupement de plusieurs follicules réalise les tubercules visibles macroscopiquement, et qui ont donné leur nom à la maladie.

Les bacilles présents dans les organes sont, soit parfois détruits et la guérison est définitive, soit plus souvent quiescents et aident à maintenir une population de lymphocytes T-mémoires spécifiques afin de prévenir toute réinfection par ce germe. Cependant ces germes quiescents peuvent se réactiver (stress, corticoïdes, irradiation, immunodépression). L'immunité spécifique est donc très imparfaite.

2. Tuberculose-maladie

Elle se déclare parfois d'emblée après la primo-infection, ou plusieurs années après. Dans nos régions elle est le plus souvent due à un réveil de bacilles quiescents : c'est la *tuberculose par réactivation endogène*. Parfois la maladie est déclenchée par surinfection avec une nouvelle souche de bacille tuberculeux : c'est la *tuberculose par surinfection*.

Lors de la tuberculose-maladie, tout organe peut être atteint (rein ou articulation) sans atteinte pulmonaire. Chez les nourrissons on observera plus volontiers des méningites et des miliaries tuberculeuses ; à l'adolescence les séreuses seront atteintes plus fréquemment tandis que les localisations pulmonaires seront vues de préférence chez les adultes.

Dans le poumon, lorsque le caséum est mal oxygéné (caséum encore solide ou caséum ramolli non évacué), le nombre de bacilles décroît ; lorsque le caséum est en grande partie évacué (cavernes à bronche de drainage ouverte), l'oxygénation est satisfaisante et le nombre de bacilles élevé. La plus grande partie des lésions observées dans la tuberculose pulmonaire semble due à l'action toxique des macrophages activés par les lymphocytes T. Ces macrophages activés libèrent également beaucoup de cytokines (interleukine-1, TNF) qui peuvent avoir un rôle immunorégulateur : blocage de la réponse des lymphocytes T (d'où infection chronique), altération de la recirculation des lymphocytes (d'où faible réaction cutanée d'hypersensibilité retardée et baisse de l'immunité spécifique).

C - Transmission de la tuberculose

M. tuberculosis étant un parasite strict de l'espèce humaine, l'homme est à la fois le réservoir et l'agent de transmission du bacille. Les malades possédant une caverne pulmonaire sont les principaux disséminateurs du bacille par l'intermédiaire de gouttelettes rejetées à l'occasion de la parole, de la toux ou de l'éternement.

Les infections autres que pulmonaires, ont un rôle épidémiologique bien moindre. Les animaux infectés au contact avec l'homme (chien, chat, singe) interviennent peu dans la dissémination de la maladie.

L'infection humaine à *M. bovis* s'effectue surtout par l'ingestion de produits laitiers contaminés. Les atteintes pulmonaires humaines à *M. bovis* peuvent être source de contamination pour d'autres sujets.

VIII - POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

A - Animal de choix : le cobaye

Il est sensible à *M. tuberculosis* et à *M. bovis* et toutes les voies d'inoculation sont efficaces ; de plus il n'est pas sensible à des germes pouvant contaminer les cultures (*Bacillus*). Les produits sont décontaminés par de la soude à 0,25 % (concentration finale), neutralisés puis injectés. En pratique, on effectue une injection sous-cutanée dans la face interne de la cuisse chez un cobaye ne réagissant pas à la tuberculine

- 10 à 15 jours après l'injection apparaît un nodule qui s'ulcère et forme un chancre qui persiste jusqu'à la mort de l'animal,
- puis apparaît une adénopathie satellite qui s'étend à tous les ganglions,
- enfin la mort de l'animal survient en un à trois mois.

À l'autopsie, des nodules blanchâtres sont observés dans la rate, le foie et les poumons ; ces organes contiennent des bacilles tuberculeux.

Cependant *M. tuberculosis* et *M. bovis* résistant à 10 u-g/ml d'INH ont une virulence très atténuée pour le cobaye. Le B.C.G. n'a pas de pouvoir pathogène pour le cobaye ; cependant à de très fortes doses apparaissent des lésions qui guérissent rapidement.

Cette inoculation n'est plus réalisée car les méthodes actuelles *in vitro* sont satisfaisantes et les cobayes sont insensibles à d'autres mycobactéries potentiellement pathogènes pour l'homme.

B - Le lapin

Il est sensible à 10 p.g de *M. tuberculosis* et *M. africanum* injectés par voie intra-veineuse : il se crée des lésions pulmonaires souvent peu importantes et régressives.

Par contre, 10 u.g de *M. bovis* provoquent par voie intra-veineuse, la mort de l'animal par tuberculose généralisée.

C - La souris

Elle est sensible à *M. tuberculosis* et à *M. bovis* par voie intra-veineuse.

D - Le phénomène de Koch

Il s'agit d'un phénomène mis en évidence uniquement chez le cobaye. L'injection de bacilles tuberculeux par voie sous-cutanée produit un chancre d'inoculation d'apparition tardive (15^e jour environ). Une deuxième injection de bacilles tuberculeux est alors réalisée par la même voie en un autre site.

1^o cas : *les deux injections sont séparées de 40 jours et plus*

- On observe un chancre suppuratif au premier point d'injection ; celui-ci demeurera jusqu'à la mort de l'animal, et la lésion évoluera de façon lente et progressive avec dissémination des bacilles dans tout l'organisme du cobaye.
- Le deuxième point d'injection devient ecchymotique en 24 à 48 heures, se nécrose et forme un ulcère superficiel sans mycobactéries qui guérit en 10 à 15 jours. Il s'agit d'une évolution vive et précoce. Cette seconde inoculation n'évolue donc pas comme la première.

2^o cas : *les deux injections sont séparées de moins de 25 jours*

Dans ce cas l'animal ne présente pas encore de sensibilité à la tuberculine et la deuxième inoculation évolue comme la première.

Le phénomène de Koch montre donc la présence de deux réactions de l'organisme :

- le phénomène de sensibilisation (ecchymose et escarre),
- le phénomène de résistance (blocage de la multiplication des bacilles et arrêt de leur dispersion).

IX - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DE LA TUBERCULOSE - MALADIE

A - Diagnostic direct

Il s'agit de la mise en évidence du bacille par l'examen microscopique et par la **culture**.

1. Les prélèvements et leur traitement

al Les prélèvements

- Crachats matinaux (5-10 ml) obtenus lors d'un effort de toux ou après aérosol d'eau salée à 10 %.
- Tubages gastriques le matin à jeun (ils correspondent à des crachats déglutis pendant la nuit). Si ces tubages doivent attendre plus de 4 heures avant d'être traités, il faut y ajouter 100 mg de NaHC03.

- Urines prélevées au milieu du jet (urines matinales et non de 24 heures).
- Les écouvillonnages peuvent être source de résultats faussement négatifs en raison de la faible quantité de matériel recueilli et de la difficulté de détacher les mycobactéries de l'écouvillon (rôle des lipides de l'enveloppe bactérienne).
- Sang prélevé soit dans un tube contenant de la saponine (système Du Pont Isolator) afin de libérer les mycobactéries des phagocytes, soit dans un tube avec anticoagulant si on utilise le système de culture radiométrique.
- Tissus, liquides pleuraux, péritonéaux, sang, pus, liquides articulaires.
Tous ces échantillons doivent être gardés à 4°C, particulièrement si un certain délai doit s'écouler entre le prélèvement et son traitement par le laboratoire.

bl Traitement

- **Produits stériles** (LCR, ponctions, biopsies, sang hémolyse par la saponine) :
Concentrer les bacilles par centrifugation si les produits sont liquides ; pour les produits solides, les broyer au mortier avec du sable et centrifuger après décantation pour avoir un culot qui servira à l'examen direct et à la culture.
- **Urines** :
Concentrer les urines par centrifugation ; faire une lame avec une fraction du culot ; le reste du culot est décontaminé soit comme un crachat, soit par H₂SO₄ (2 % final) pendant 15 mn et neutralisé.
- **Crachats** :
Il faut les homogénéiser, c'est-à-dire les rendre fluides et éliminer les germes banals. On décrit de nombreuses techniques :
 - la technique Petroff (soude 2 % final), à 37°C pendant une heure sous agitation,
 - la technique Tacquet et Tison (soude 0,5-0,7 % et SDS 1,5-2 %) pendant 40 mn sous agitation à température ambiante,
 - la technique au chlorure de benzaikonium (ammonium quaternaire)-phosphate trisodique, pendant 30 mn sous agitation,
 - la technique à l'acétylcystéine-soude pendant 15 minutes sous agitation,
 - la technique au cetyl-pyridinium (ammonium quaternaire),
 - la technique à l'acide oxalique 2,5 % pour les crachats contaminés par des *Pseudomonas*.
 Après ce traitement, les culots obtenus après neutralisation et centrifugation, sont déposés sur une lame pour l'examen direct, et ensemencés.

2. L'examen direct

Une fraction du culot est étalée sur une lame et colorée.

- Méthode rapide de dépistage par microscopie à fluorescence : la coloration à l'auramine 0 (objectif 40, bâtonnets jaune-vert fluorescents). Les mêmes lames peuvent être colorées au Ziehl pour confirmation d'un résultat positif.
- Coloration de Ziehl-Neelsen à la fuchsine phéniquée en microscopie classique à immersion. Une lame doit être observée 20 mn (objectif 100, bâtonnets rosés) avant de conclure à la négativité de l'examen.

L'abondance de bacilles acido-alcoolo-résistants observés doit être exprimée sous forme d'un résultat semi-quantitatif.

3. Culture

al Milieux solides

On ensemence des tubes de Lôwenstein-Jensen et/ou de Coletsos avec les culots. Les produits à ensemencer peuvent être mis en suspension dans 1 à 2 ml d'albumine à 2 % pH 6,8 pour favoriser les cultures.

Habituellement on ensemence, plusieurs tubes de milieux à l'œuf, par prélèvement.

Certains auteurs préconisent d'ensemencer en outre un milieu gélose permettant un diagnostic précoce et un milieu à l'œuf additionné d'antibiotiques (acide

nalidixique, pénicilline) pour des prélèvements contaminés. Toute la surface du milieu doit êtreensemencée ; il faut boucher au coton ou ne pas visser hermétiquement la capsule pour laisser sécher l'inoculum pendant 24 à 72 heures à 37°C. Enfin il faut capuchonner ou visser hermétiquement les tubes pour éviter la dessiccation du milieu. Ces cultures sont gardées trois mois à 37°C. Les milieux géloses sont incubés en présence de 5-10 % de CO₂ dans des sacs plastiques.

Les prélèvements d'origine superficielle seront incubés quatre mois à 30°C et 37°C pour la recherche de certaines mycobactéries non tuberculeuses (*M. marinum*, *M. ulcérons*, *M. haemophilum*).

La première lecture s'effectue à la première semaine pour éliminer les tubes contaminés (jusqu'à 5 %, le taux de contamination est normal et acceptable) et pour repérer les mycobactéries à croissance rapide. Les bacilles tuberculeux poussent en trois semaines ou bien davantage, c'est pourquoi les cultures seront gardées pendant 3 mois environ et régulièrement contrôlées.

bl Milieux liquides

La culture des mycobactéries peut être réalisée directement en milieu liquide. Les prélèvements stériles et ceux décontaminés par traitement sontensemencés dans des flacons hermétiques contenant un milieu liquide de Middiebrook additionné d'une association d'antibiotiques et d'antifongiques (polymyxine B, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime et agiocilline).

Dans la méthode radiométrique (type Bactec), on utilise un milieu liquide 7 H12 additionné de palmitate marqué au ¹⁴C ; pour les hémocultures, ce milieu est encore supplanté. On mesure 2 à 3 fois par semaine l'augmentation de ¹⁴CO₂ dans l'atmosphère de culture. La **croissance** des mycobactéries de la tuberculose est détectable en moyenne dès la fin de la première semaine de culture. Les flacons sont contrôlés pendant 6 semaines.

Une autre méthode non radiométrique utilise un milieu biphasique. Des lames couvertes de milieux géloses (gélose chocolat, milieu 7H11 et milieu 7H11 additionné de P-nitro et acétylamino p hydroxypropionphénone) sont immergées régulièrement par retournement dans un milieu liquide 7H9. La croissance bactérienne s'observe en moyenne en 2 semaines.

4. Inoculation au cobaye

L'inoculation au cobaye est **très peu utilisée** car les milieux de culture actuels sont plus performants.

Elle est parfois utile pour purifier des cultures de mycobactéries contaminées par des *Bacillus* ou dans le cas de produits très contaminés (ajouter alors des antibiotiques aux produits homogénéisés par la soude).

Elle sert surtout à confirmer le pouvoir pathogène d'une mycobactérie.

5. Identification des mycobactéries en culture

Il faut procéder dans l'ordre :

al Coloration de Ziehl

Vérifier que les colonies, pigmentées ou non, à croissance rapide ou non, sont des bacilles acido-alcoolo-résistants.

bl Vitesse de croissance à 37°C et température de croissance

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, B.C.G. poussent lentement (3 semaines ou davantage). L'appréciation de la vitesse de croissance s'effectue sur une subculture de colonies **isolées**.

ci Pigmentation et aspect des colonies

Certaines mycobactéries sont pigmentées en jaune-orangé, soit à l'obscurité (scotochromogènes), soit uniquement après exposition à la lumière (photochromogènes). Les mycobactéries tuberculeuses sont de couleur crème. L'aspect rugueux ou lisse des colonies peut orienter l'identification.

dl Réactions biochimiques et résistance à des agents antibactériens*a. diagnostic positif****M. tuberculosis***

Colonies eugoniques (R) habituellement

Niacine (+)

Nitrate (+) (technique de Virtanen)

Catalase 68°C (-)

Af. bovis

Colonies dysgoniques (S) à croissance très lente (6 semaines)

Niacine (-)

Nitrate (-)

Catalase 68°C (-)

TCH sensible

Pyrazinamide résistant

D-cyclosérine sensible

B.C.G.

Colonies eugoniques comme celles de *M. tuberculosis*

Biochimiquement il s'agit de *M. bovis* résistant à la D-cyclosérine et sensible aux autres antibiotiques anti-tuberculeux.

Vitesse de croissance semblable à celle de *M. tuberculosis*

M. africanum

Colonies dysgoniques avec un centre acuminé sur milieu de Lôwenstein-Jensen

Niacine (+/-) ou positivité retardée (42^e jour de culture)

Nitrate (-/+)

TCH et Tbi : sensible ou résistant

Catalase à 68°C (-)

Il existe souvent une discordance entre le nombre de bacilles vus à l'examen direct et le faible nombre de colonies observé à la culture.

M. africanum présente des caractères intermédiaires entre *M. tuberculosis* et *M. bovis*. Il pousse lentement et donne des colonies dysgoniques sur milieu de Lôwenstein-Jensen. On en distingue 3 types selon leurs réactions biochimiques (réduction des nitrates selon Tacquet) et de résistance aux agents antibactériens TCH et Tbi : types Rwanda, Dakar et Yaoundé. *M. africanum* est observé dans 30 à 40 % des tuberculoses d'Afrique Occidentale et Centrale.

*P. diagnostic différentiel***- Mycobactéries Niacine (+)**

M. tuberculosis, *M. simiae* (scotochromogène), parfois *M. marinum* (photochromogène), parfois *M. chelonae* (croissance rapide).

- En présence d'une mycobactérie à croissance lente, non pigmentée, niacine (-), nitrate (-) et catalase 68°C (-), il faut évoquer : *M. bovis*,

le B.C.G., *M. gastri*, *M. malmoense* et parfois *M. avium-intracellulare* dont l'activité catalasique à 68°C est souvent faible. La sensibilité au TCH est un des caractères permettant de différencier *M. bovis* ; le B.C.G. doit être éliminé par la recherche de la sensibilité à la D-cyclosérine et/ou par l'inoculation au cobaye.

el Identification présomptive avec culture directe en milieu liquide

Dans le système Bactec, les bactéries ayant poussé en milieu liquide sont transférées dans un autre flacon additionné du composé NAP (p-nitro et acétylmino (i hydroxypropiophénone). La croissance des bactéries de la tuberculose est inhibée par ce composé, tandis que celle des autres mycobactéries continue à s'effectuer. Cette croissance est comparée à celle qui se produit dans un autre flacon dépourvu de NAP. On étudie en outre la vitesse de croissance en milieu liquide (assez lente pour les mycobactéries de la tuberculose) et les propriétés morphologiques et tintoriales des mycobactéries. Cette différenciation entre bactéries tuberculeuses et non-tuberculeuses revêt une importance clinique et épidémiologique en raison de sa précocité. Cependant le BCG n'est pas différencié de *M. tuberculosis* et des méthodes complémentaires devront affiner l'identification.

fl Identification à l'aide des sondes nucléiques spécifiques

Des sondes d'acides nucléiques spécifiques du groupe *tuberculosis*, de *M. avium-intracellulare*, de *M. kansasii* et de *M. gordonae* permettent l'identification de certaines espèces ayant crû en milieux solide ou liquide. Elles sont utiles pour différencier les mycobactéries tuberculeuses des non-tuberculeuses et les résultats obtenus sont très satisfaisants. Elles permettent même de détecter des mycobactéries tuberculeuses dans des prélèvements très riches en bacilles. Leur inconvénient est encore leur radiomarquage.

6. Étude de la sensibilité aux antibiotiques antituberculeux

al Méthode classique

L'efficacité clinique d'un antibiotique dépend de la proportion de mutants résistants présents naturellement au sein de la souche. L'étude *in vitro* de la sensibilité d'une souche aux substances antituberculeuses s'effectue par la « **méthode des proportions** » réalisée en milieu solide et qui permet de détecter le taux de mutants résistants à chaque antibiotique au sein de la souche à étudier.

En pratique courante on utilise la méthode des proportions de Canetti, Rist et Grosset : un coffret d'antibiogramme est constitué de trois jeux identiques de milieux formés chacun de deux tubes de milieux de Lôwenstein-Jensen servant de témoins et de plusieurs tubes du même milieu additionné d'une concentration d'antibiotiques (INH, éthambutol...). Cette concentration s'appelle *concentration critique*.

On effectue une suspension de la souche à tester dans de l'eau distillée à une concentration de 1 mg/ml par comparaison avec un étalon, et on réalise trois dilutions : 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-5} . Pour chaque dilution on ensemence un jeu de tubes (0,2 ml/tube).

La lecture consiste à mesurer le **pourcentage de bactéries résistantes** pour chaque antibiotique testé. Ce pourcentage est comparé à un nombre appelé *proportion critique* qui diffère selon les antibiotiques. Si le pourcentage de survivants est supérieur à la proportion critique, la mycobactérie est considérée comme résistante ; si ce pourcentage lui est inférieur, elle est considérée comme sensible. La lecture s'effectue au 28^e jour ; pour *M. bovis* il faut souvent attendre 40 à 50 jours avant de pouvoir lire l'antibiogramme.

Les concentrations critiques d'antibiotiques sont totalement différentes de la CMI de cet antibiotique ; la proportion critique n'a rien de commun avec le taux de mutation de résistance spontanée à cet antibiotique. Proportion critique et concentration critique sont caractéristiques d'un antituberculeux dans un milieu de culture donné. Ces deux nombres ont été déterminés sur des bases bactériologiques, pharmacologiques et thérapeutiques. La concentration critique diffère selon que l'antibiogramme est effectué sur milieu à l'œuf ou sur milieu gélose car la présence des protéines de l'œuf conduit à une moins grande biodisponibilité de certains antibiotiques ; de plus le chauffage à 85°C pendant 50 minutes nécessaire à la coagulation du milieu à l'œuf peut réduire l'activité de certains antibiotiques.

CONCENTRATIONS CRITIQUES D'ANTIBIOTIQUES ET PROPORTIONS CRITIQUES DE MUTANTS RÉSISTANTS

Antibiotique	Concentration critique (u.g/ml)		Proportion critique (%)
	(Lôwenstein-Jensen)	(7H10)	
INH*	0,2	0,2	1
Streptomycine	4	2	1
PAS**	0,5	2	1
Ethionamide	20	5	10
D-cyclosérine	30	20	10
Rifampicine	40	1	1
Ethambutol	2	5	1
Pyrazinamide	200	50	10

* Hydrazide de l'acide isonicotinique

** Acide paraaminosalicylique

EXEMPLE D'ANTIBIOGRAMME D'UNE MYCOBACTÉRIE

Dilution	Témoins		Rifampicine 40 ug/ml (prop. critique 1%)	Streptomycine 4 u.g/ml (prop. critique 1%)
	10-1	∞*	∞	50**
10-3	∞	∞	0	110
10-5	27	23	0	1

* Culture confluyente : numération des colonies impossible

** Nombre de colonies ayant poussé dans le tube

A la dilution 10⁻⁵ on compte en moyenne 25 colonies par tube témoin. Aux dilutions 10⁻³ et 10⁻¹ les cultures sont confluentes dans les tubes témoins et le nombre de bactéries par tube témoin est estimé respectivement à 25 x 10² et 25 x 10⁴.

Le pourcentage de mutants résistants aux antibiotiques est calculé de la manière suivante :

Rifampicine : $50 / (25 \times 10^4) = 2 \times 10^{-4} = 0,02 \%$: souche sensible à la rifampicine.

Streptomycine : $110 / (25 \times 10^2) = 4 \times 10^{-2} = 4 \%$: souche résistante à la streptomycine.

Cette méthode permet d'effectuer un **antibiogramme indirect** à partir de la culture d'une mycobactérie ou encore un **antibiogramme direct** à partir d'un produit pathologique préalablement décontaminé, à condition que ce dernier soit suffisamment riche en bacilles (au moins 1 à 10 pour 10 champs à l'immersion).

L'étude de la sensibilité des mycobactéries à la pyrazinamide doit s'effectuer à pH acide (5,5). Il faut donc que les tubes témoins montrent une croissance à ce pH, ce qui

est parfois difficile à obtenir. C'est la raison pour laquelle les tubes témoins utilisés (sans antibiotique) sont différents de ceux employés pour tester les autres antibiotiques antituberculeux.

bl Méthode radiométrique en milieu liquide

Un antibiogramme des mycobactéries du groupe *tuberculosis* peut être obtenu plus rapidement à l'aide du système Bactec (milieu 7H12 additionné d'un substrat marqué au ¹⁴C). La suspension de mycobactéries estensemée dans un flacon témoin ne contenant pas d'antibiotique et dans divers flacons contenant chacun un antibiotique (INH, streptomycine, rifampicine, éthamhitol, pyrajinamide). Un germe est considéré comme sensible à l'antibiotique testé si sa croissance, suivie par la production de ¹⁴CO₂, est inhibée de plus de 99% en présence de l'antibiotique par rapport à celle observée en l'absence d'antibiotique. Le résultat de l'antibiogramme s'obtient habituellement en une semaine au lieu des 3 semaines de la méthode classique.

Cette technique permet aussi une détermination rapide de la CMI d'un antituberculeux donné, en étudiant au minimum 3 concentrations différentes de ce produit.

La technique radiométrique présente l'avantage de la rapidité. Elle ne permet cependant pas encore de tester la sensibilité des mycobactéries dites atypiques.

7. Détection rapide et sensible de mycobactéries directement dans les produits pathologiques : laPCR

Une méthode d'amplification génique in vitro (PCR pour polymerase chain reaction) devrait être prochainement commercialisée (1992). Elle permettra de détecter et d'identifier simultanément des mycobactéries directement dans les produits pathologiques en quelques heures, sans passer par l'étape de la culture. Les résultats préliminaires obtenus par comparaison aux méthodes de culture sont satisfaisants. L'avantage de cette technique réside dans sa rapidité ; son inconvénient est de ne pas permettre la réalisation d'antibiogrammes puisqu'aucune souche n'est isolée par PCR.

B - Diagnostic sérologique

Il n'est jamais entré en pratique et ne présente pas aujourd'hui d'intérêt diagnostique. En effet il peut exister des anticorps chez les sujets infectés, mais il en existe également chez les sujets vaccinés par le B.C.G. En outre il n'est pas encore démontré qu'ils représentent un bon marqueur d'infection ou d'absence d'infection ou d'efficacité d'un traitement antibiotique.

X - TRAITEMENT

A - Curatif

Une caverne tuberculeuse comporte environ 10⁸ bacilles, donc contient spontanément 100 à 1 000 germes résistant à un antibiotique. Il faudrait donc au moins 2 antibiotiques pour réaliser un traitement efficace. En pratique **on en associe trois à quatre** car 5 à 10 % des souches infectantes sont résistantes d'emblée, avant tout traitement, à un antibiotique au moins. C'est la **résistance primaire**.

Actuellement la résistance primaire se répartit comme suit :

- streptomycine : 6 % des souches,
- INH : 3 %,
- rifampicine : 0,2 %,
- éthambutol : 0,1 %.

Cette résistance primaire est stable statistiquement.

Après 2 mois de traitement, si les cultures faites tous les mois sont négatives, on ne donne plus que **deux antibiotiques** parce qu'on possède alors l'antibiogramme et parce que la population bactérienne résiduelle est de l'ordre de 10^2 bactéries seulement. Si les cultures restent positives après quelques mois de traitement, il faudra refaire un antibiogramme car **une résistance secondaire** aura pu apparaître (traitement mal suivi).

Cette résistance secondaire tend à diminuer.

Les **antituberculeux majeurs** utilisés sont :

INH, rifampicine, éthambutol, streptomycine, pyrazinamide (ce dernier est inactif sur *M. bovis*)

En cas de résistance multiple on utilise des **antituberculeux mineurs** : PAS (acide para-aminosalicylique), kanamycine, D-cyclosérine, éthionamide, prothionamide, viomycine, capréomycine.

La durée du traitement est actuellement de l'ordre de 6 à 9 mois en l'absence de complications.

Signalons que les fluoroquinolones (ofloxacin) sont actives sur les mycobactéries de la tuberculose.

B - Traitement prophylactique

1. Dépistage radiologique

Étudiants, embauche (médecine du travail), travailleurs de laboratoires, médecins...

2. Chimio prophylaxie

INH pour les sujets contact. Un seul antibiotique suffit car ces sujets sont très peu bacillifères. Il faut contrôler si la souche isolée chez le malade est sensible à l'INH.

3. Contrôle de la tuberculose bovine

Les cas de tuberculose humaine à *M. bovis* diminuent parallèlement au contrôle de la tuberculose bovine et à la pasteurisation du lait.

4. Vaccination par le B.C.G.

- Préparation

Il s'agit d'une souche de *M. bovis* virulente à l'origine. Après 230 passages sur pomme de terre billée glycinée, cette souche a perdu son pouvoir pathogène pour tous les animaux et l'homme.

Le vaccin est préparé à partir du voile obtenu en milieu de Sauton ; il est soit broyé et mis en suspension en milieu liquide (stable 3 à 4 semaines), soit lyophilisé (meilleure conservation).

- Mode d'administration :

- Buccal (peu efficace)
- Injection intra-dermique : technique très efficace, bien quantifiable mais accompagnée de 5 % de réaction locale importante
- Scarification : technique très efficace, peu d'accidents, mais peu précise.

- Indications :

La vaccination s'effectue chez des sujets ayant une réaction d'hypersensibilité retardée négative à la tuberculine.

Les enfants sont souvent vaccinés au premier trimestre de la vie, mais la vaccination n'est obligatoire en France qu'à l'âge de 6 ans.

- Contre-indications :

S'agissant d'une souche vivante, les malades ayant un déficit immunitaire, et les femmes enceintes ne doivent pas être vaccinés. Autres contre-indications : eczéma du nourrisson, prématurité, corticothérapie, maladie aiguë évolutive.

Le **B.C.G.**, une fois injecté, produit en trois semaines un chancre d'inoculation avec adénopathie satellite. L'immunité apparaît en même temps ou un peu plus tard que l'hypersensibilité retardée. L'efficacité de la vaccination est contrôlée par cuti-réaction 2 mois après l'inoculation.

L'immunité conférée par la vaccination est imparfaite ; elle n'est pas définitive non plus et des rappels peuvent être nécessaires.

Les incidents sont rares (moins de 1 %<?) :

- adénite fistulisée qui cède spontanément en quelques mois ou ulcération du nodule vaccinal,
- abcès sous-cutané en cas d'injection sous-cutanée,
- lupus post-vaccinaux, atteintes ostéo-articulaires (nourrissons) et B.C.G.ites mortelles dues à un déficit immunitaire ignoré lors de la vaccination.

- Efficacité du B.C.G. :

Depuis 1921, plusieurs centaines de millions de vaccinations ont été effectuées, mais le degré de protection conféré par le B.C.G. demeure l'objet de discussion.

Les huit essais principaux effectués ont donné des résultats contradictoires : pour les essais effectués en zone tempérée, la protection est d'environ 80 % ; pour des essais effectués en zone tropicale, la protection semble faible ou nulle.

Or en zone tropicale l'infection latente par des mycobactéries non tuberculeuses est très répandue, ce qui entraîne une hypersensibilité tuberculique de faible degré et donc une certaine immunité contre la tuberculose, suffisante pour masquer l'effet propre du B.C.G., mais insuffisante pour protéger réellement les sujets contre la tuberculose.

Actuellement il semble que la vaccination par le B.C.G. exerce un effet protecteur en bloquant la dissémination hématogène des bactéries, limitant ainsi l'infection à des proportions subcliniques. Le B.C.G. n'empêche pas la primo-infection et n'a pas de rôle thérapeutique vis-à-vis d'une infection constituée ; il réduit surtout la probabilité de survenue d'une méningite tuberculeuse, surtout chez les jeunes enfants. C'est la raison pour laquelle, au plan international, on recommande la vaccination par le B.C.G. de tous les enfants vivant dans des zones où l'on observe un taux élevé de conversion spontanée des réactions d'hypersensibilité à la tuberculine.

Signalons enfin l'utilisation du B.C.G. dans certaines affections néoplasiques et dans le traitement de la lèpre lépromateuse comme moyen de stimulation non spécifique de l'immunité cellulaire.

C - Mesures de précaution au laboratoire

Les personnes travaillant dans les laboratoires de bactériologie médicale font partie des sujets plus particulièrement exposés au risque de tuberculose. C'est pourquoi certaines précautions sont indispensables : en particulier il faut minimiser la dispersion de mycobactéries dans l'air et éviter l'inhalation de bacilles tuberculeux.

Le personnel travaillant avec des mycobactéries doit subir un examen médical une fois par an. L'hypersensibilité retardée à la tuberculine doit être contrôlée chaque année chez les sujets négatifs ; chez les autres, une radiographie du thorax doit être effectuée chaque année.

Les anses de platine peuvent être dangereuses à utiliser car le film de liquide qu'elles transportent peut se briser et disperser des germes tout alentour ; l'utilisation de pipettes Pasteur est préférable avec un dispositif de pipetage adapté. **Le pipetage à la bouche doit être proscrit** ; le lavage des mains doit être soigneux.

Les laboratoires seront équipés de **hottes aspirantes** (0,4 m/s) protégeant l'opérateur avec certitude, et sous lesquelles seront effectuées les opérations suivantes : transfert d'échantillons d'un tube à un autre, agitation de solutions virulentes, préparation des étalements sur lame, ensemencement de milieux. Un coton imbibé de désinfectant doit toujours être disponible sous la hotte afin de nettoyer les bords des tubes dans lesquels ont été transférées des solutions contaminées. Le plan de travail de la hotte doit toujours être désinfecté avant et après usage.

Les centrifugeuses et agitateurs doivent être situés dans des endroits spécialement ventilés.

BIBLIOGRAPHIE

Se reporter à la fin du chapitre suivant.

Chapitre XXXIV MYCOBACTÉRIES, DITES ATYPIQUES

HISTORIQUE

- De 1880 à 1900 sont décrits chez l'homme les bacilles de la lèpre et de la tuberculose ; d'autres bacilles acido-alcoolo-résistants sont aussi observés chez des animaux.
En 1885 est décrit, chez l'homme, le « bacille du smegma », actuellement nommé *Mycobacterium smegmatis*.
- Entre 1900 et les années 1950, des Mycobactéries « non tuberculeuses » sont observées chez l'homme à partir de divers prélèvements (amygdales, peau, liquide pleural, expectorations, urines).
Mais il était difficile d'associer clairement la présence **de** ces germes à une maladie humaine.
- A partir des **années** 1950, émerge le concept d'infections humaines à mycobactéries non tuberculeuses parce que les examens de laboratoire deviennent plus performants, que la fréquence de la tuberculose commence à diminuer grâce aux antibiotiques et que des corrélations bactério-cliniques sont effectuées.
- En 1954, un groupe dirigé par Runyon étudie plusieurs centaines de souches isolées de patients, ce qui aboutit, en 1959, à la classification par ces auteurs des mycobactéries.
Ces germes ont reçu plusieurs appellations :
bacilles paratuberculeux, pseudotuberculeux, non classés, anonymes, non tuberculeux, atypiques, opportunistes, tuberculoïdes.
Actuellement, il vaut mieux parler de mycobactéries dites atypiques ou de bacilles autres que ceux **de** la tuberculose (MOTT = mycobacteria other than tuberculous).

1 - CLASSIFICATION BACTÉRIOLOGIQUE DE RUNYON

En 1959, Runyon propose une classification bactériologique des mycobactéries non tuberculeuses. Cette classification ne comprend donc ni *M. tuberculosis*, ni *M. bovis*, ni *M. africanum*.

M. leprae, non cultivable, n'en fait pas partie. Cette classification est fondée sur la vitesse de croissance des bactéries *in vitro* et sur les conditions de pigmentation éventuelles de ces germes en culture.

- **Vitesse de croissance :**
L'obtention de colonies matures et macroscopiquement visibles en plus de 5 jours correspond à une croissance lente et en moins de 5 jours à une croissance rapide.
- Colonies **photochromogènes :**
Ce sont des colonies non pigmentées si leur croissance a eu lieu à l'obscurité et pigmentées après exposition à la lumière en présence d'oxygène.

Colonies scotochromogènes :

Ce sont des colonies pigmentées que leur croissance ait eu lieu à la lumière ou à l'obscurité.

Groupe I

mycobactéries à croissance lente et photochromogènes

ex : *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. asiaticum*

Groupe II

mycobactéries à croissance lente et scotochromogènes

ex : *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. xenopi*, *M. szulgai*

Groupe III

mycobactéries à croissance lente et non pigmentées

ex : *M. avium-intracellulare*, *M. malmoense*, *M. gastri*, ***M. haemophilum***,
M. nonchromogenicum, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. ulcérons*

Groupe IV

mycobactéries à croissance rapide, pigmentées ou non

ex : *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. vaccae*

Cette classification n'est pas absolue car certaines mycobactéries pigmentées peuvent perdre leur pigment après subculture ; par ailleurs, *M. szulgai* est photochromogène à 25°C et scotochromogène à 37°C. *M. xenopi*, scotochromogène à la primoculture uniquement, est souvent classée dans le groupe III en raison de ses nombreuses analogies avec les mycobactéries aviaires.

II - CLASSIFICATION CLINIQUE DES MYCOBACTÉRIES EN FONCTION DE LEUR POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME

A - Mycobactéries considérées comme toujours pathogènes

À côté de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* et *M. leprae* il existe des mycobactéries rarement rencontrées :

1. *M. ulcérons* (groupe III)

Responsable d'ulcères cutanés indolores, chroniques et extensifs, sans réaction cellulaire. C'est l'ulcère de Baimsdale ou de Buruli observé en Australie, en Afrique Centrale et en Amérique Centrale et qui pourrait être dû à une toxine sécrétée par la bactérie.

2. *M. haemophilum* (groupe III)

Cette bactérie a été décrite pour la première fois en Israël en 1978, et est responsable de lésions cutanées disséminées (infiltrations cutanées, abcès, granulomes, fistules) avec réaction cellulaire.

3. *M. szulgai* (groupe II)

Décrite en 1972, cette bactérie est surtout responsable d'affections pulmonaires simulant une tuberculose mais aussi de bursites (de l'olécrâne). Elle a été retrouvée aussi dans des adénopathies et des lésions cutanées.

Son habitat naturel est inconnu.

4. *M. malmoense* (groupe III)

Décrite en 1977 à Malmö, cette bactérie a toujours été associée à des affections pulmonaires (Suède, Pays de Galles, Australie).

B - Mycobactéries souvent pathogènes

1. *M. marinum* (groupe I)

Cette bactérie est responsable de granulomes cutanés chroniques siégeant de préférence au niveau des membres. C'est le « granulome des piscines » qui guérit spontanément en quelques mois le plus souvent, ou qui provoque des ulcérations profondes avec réaction cellulaire (On observe parfois des tuméfactions étagées sur les voies lymphatiques, simulant une sporotrichose).

Le réservoir naturel du germe est représenté par les animaux à sang froid, particulièrement les poissons exotiques en aquarium, les piscines et le littoral des mers chaudes.

2. *M. kansasii* (groupe I)

Cette espèce cause des affections pulmonaires pouvant ressembler à une tuberculose cliniquement et histologiquement. Mais on l'a retrouvée aussi dans des adénopathies, des affections cutanées, des bursites, des infections urogénitales et dans des méningites. Aux U.S.A. cette mycobactérie est assez fréquemment rencontrée comme cause d'infection pulmonaire.

Le réservoir naturel de ce germe est inconnu. On isole parfois la bactérie d'échantillons d'eaux et de lait et exceptionnellement chez des bovidés et des porcs.

Signalons que les souches ayant une forte activité catalasique sembleraient plus pathogènes que celles ayant une faible activité catalasique.

3. *M. simiae* (groupe I)

Ce germe est parfois responsable d'affections pulmonaires chez l'homme ; on l'a parfois trouvé associé à *M. tuberculosis* chez certains patients. Le réservoir du germe est inconnu ; cette bactérie n'a été isolée que chez le singe et l'homme.

4. *M. scrofulaceum* (groupe II)

D est responsable d'adénopathies sous-maxillaires purulentes chez les enfants de moins de 8 ans. Quelques cas d'affections pulmonaires ont aussi été décrits, en particulier chez des malades ayant déjà des cavernes d'origine tuberculeuse. Le réservoir du germe est mal connu et certaines souches ont été isolées du lait, d'huîtres, des eaux et du sol.

5. *M. avium* et *M. intracellulare* (groupe III) (ou bacille de Battey)

Ces deux espèces ont été séparées initialement sur la base de leur pouvoir pathogène pour la poule et le lapin qui sont sensibles uniquement à l'injection de *M. avium* par voie intra-veineuse. Mais biochimiquement ces deux espèces ne peuvent être différenciées et font partie du complexe *avium-intracellulare*. Ce groupe n'est pas pathogène pour le cobaye. Chez l'homme ce complexe est responsable d'affections pulmonaires.

En outre, chez l'enfant, ce germe est parfois responsable d'adénopathies cervicales.

Des infections articulaires, génito-urinaires et méningées ont parfois été décrites.

Depuis le déclenchement de l'épidémie de SIDA, les mycobactéries atypiques, notamment celles du groupe *M. avium-intracellulare*, ont une fréquence d'isolement accrue. En effet, les mycobactérioses disséminées occupent, après les pneumonies à *Pneumocystis carinii* et les infections généralisées à Cytomégalovirus, la 3^e place parmi les infections opportunistes terminales chez les malades atteints de SIDA. Les mycobactéries en cause peuvent être isolées par hémocultures, cultures de moelle osseuse ou par coprocultures. Ces mycobactéries du groupe *avium-intracellulare* sont trouvées dans les organes de près de la moitié des malades morts de SIDA aux U.S.A.

M. avium-intracellulare résiste habituellement à la plupart des antituberculeux, y compris à la rifampicine. L'efficacité clinique de l'ansamycine et de la clofazimine est discutée.

Le germe s'isole aussi chez les oiseaux atteints de tuberculose aviaire, chez les mammifères et dans l'environnement ; le germe semble rester viable et virulent dans le sol pendant plusieurs années.

6. *M. xenopi* (groupe II)

Cette espèce est souvent responsable d'affections pulmonaires chroniques en Europe du Nord et en Australie. Elle vient, à Paris, en troisième place après *M. tuberculosis* et *M. bovis*. Parfois elle colonise d'anciennes lésions tuberculeuses ; elle a aussi été isolée d'amygdales.

Le germe a été trouvé dans de l'eau de robinet chaude ou froide, dans le milieu extérieur et rarement chez l'animal (porc).

C - Mycobactéries peu pathogènes

1. *Mycobacterium asiaticum* (groupe I)

Initialement isolée chez le singe, cette mycobactérie a été trouvée chez l'homme aux États-Unis et en Australie.

2. *Mycobacterium fortuitum* et *M. chelonae* (groupe IV)

Ces deux bactéries sont souvent groupées sous le vocable de « complexe *fortuitum* ».

Ces germes peuvent se trouver partout dans l'environnement (eaux, sol, poussières) et chez les animaux à sang froid (poissons, grenouilles). C'est un commensal habituel de l'homme.

Chez l'homme ils provoquent surtout des abcès au point d'injection de produits médicamenteux.

On les trouve dans les infections après chirurgie orthopédique (évolution lente), ainsi que dans des kératites et des arthrites. De rares abcès pulmonaires ont été observés sur des lésions pulmonaires préexistantes, ou après inhalation de particules huileuses ou de corps étrangers.

Cependant, on peut observer des colonisations prolongées du tractus respiratoire, sans signes cliniques évidents.

C'est la mycobactérie la plus souvent responsable d'infections graves post-chirurgicales chez des malades soumis à un traitement immuno-suppresseur. Il s'agit d'infections à incubation et à évolution longues.

D - Mycobactéries considérées comme non pathogènes pour l'homme

1. Des espèces pathogènes pour des animaux :

- *M. paratuberculosis*, agent de l'entérite diarrhéique hypertrophiante des bovidés (ou bacille de Johne), croissant sur des milieux supplémentés en mycobactine J (sidérophore des mycobactéries) ;
- *M. microti*, agent de la tuberculose du campagnol ;
- *M. lepraemurium*, agent de la lèpre murine (Bacille de Stefansky), difficile à cultiver, utilisé par Merkien et Cottenot pour le sérodiagnostic de la lèpre ;
- *M. farcinogenes*, agent du farcin du bœuf du Tchad ;
- *M. sénégalaise*, agent du farcin du bœuf du Sénégal.

2. Des espèces saprophytes trouvées tant dans l'environnement que chez l'homme :

- *M. gordonae* : c'est une mycobactérie saprophyte très répandue dans la nature ;
- *M. flavescens* : c'est un saprophyte fréquent dans l'environnement et au laboratoire ;
- mycobactéries du complexe « *radish* » ou « *terrae* ». Ce sont aussi des saprophytes assez répandus : *M. gastri*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*.

Ht - RESERVOIR DE GERME ET EPIDEMIOLOGIE

Les mycobactéries atypiques sont des bactéries largement répandues dans la nature. Ubiquitaires, elles ont été isolées de l'eau, de la terre, de végétaux et de nombreux animaux tant domestiques que sauvages, mais il n'existe pas à proprement parler de réservoir naturel dûment démontré comme c'est le cas pour *M. tuberculosis* ou *bovis*. Ces germes sont fréquemment isolés des circuits de distribution des eaux, y compris dans les hôpitaux.

Les sujets les plus exposés aux mycobactérioses sont ceux qui présentent un déficit global de l'immunité cellulaire (cancéreux, transplantés, sidéens), ou un déficit local de l'immunité par diminution de l'activité des macrophages alvéolaires (silicose, pneumoconiose). Ces infections peuvent produire des adénopathies chez les enfants. Elles sont souvent bénignes, et ne touchent souvent qu'un ganglion lymphatique. La distribution de ces ganglions infectés suggère une colonisation localisée des muqueuses nasopharyngée, bronchique et aussi intestinale par des bactéries d'origine hydrique. L'homme s'infecte en buvant de l'eau contaminée ou étant exposé à des aérosols produits par de l'eau du robinet (douches). Il existe également des infections liées à l'introduction accidentelle de germes dans les tissus (seringues, implantation de matériel étranger contaminé).

IV - ORGANES LE PLUS FRÉQUEMMENT ATTEINTS

A - Le poumon

Il représente la cible la plus fréquemment atteinte (80-90%) par ces mycobactéries, en particulier par *M. kansasii*, *M. avium-intracellulare* et *M. xenopi*. Plus rarement sont incriminés : *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*,

M. fortuitum-chelonae, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. asiaticum*. Différentes formes cliniques existent, allant des lésions asymptomatiques découvertes lors d'une radiographie de routine, jusqu'aux lésions cavitaires accompagnées d'hémoptysie.

Le malade-type est un homme du sexe masculin, âgé de plus de 40 ans et présentant des lésions pulmonaires chroniques. Les mineurs, les soudeurs à l'arc sont particulièrement exposés.

Les facteurs favorisant l'écllosion d'une mycobactériose pulmonaire non tuberculeuse sont :

- les facteurs liés à la nature du germe infectant,
- les facteurs liés à la résistance de l'organisme infecté,
 - le niveau de la résistance locale lié à des affections broncho-pulmonaires sous-jacentes (pneumoconioses, bronchite chronique, dilatation des bronches, séquelles de tuberculose, cancer pulmonaire)
 - le niveau de la résistance générale.

Cependant des cas sont parfois observés chez des femmes, des hommes jeunes sans lésions pulmonaires préexistantes ou sans déficit de l'immunité cellulaire.

L'isolement de mycobactéries saprophytes à partir d'expectorations est fréquent. C'est pourquoi le diagnostic de mycobactériose pulmonaire ne sera porté que sur la **convergence des arguments** suivants :

al absence de mycobactérie de la tuberculose (les infections mixtes étant fréquentes) ;

bl isolement du germe à plusieurs reprises, à plusieurs jours ou semaines d'intervalle avec un nombre important de colonies à la culture et/ou avec des examens microscopiques directs positifs (Ziehl) ;

cl signes cliniques et radiologiques plus ou moins évocateurs d'une tuberculose ;

dl éventuellement isolement de la mycobactérie directement dans les lésions **après** exérèse chirurgicale ou autopsie.

Contrairement à la tuberculose, ces mycobactérioses pulmonaires ne sont habituellement pas contagieuses d'homme à homme : les mycobactéries en cause proviennent de l'environnement.

B - Les ganglions lymphatiques

La plupart des cas surviennent chez des enfants de moins de 5-8 ans (extrêmes : 7 mois à 12 ans). Ces adénopathies froides sont surtout cervicales, mais peuvent siéger parfois au niveau des membres ou dans la région parotidienne. Il s'agit d'adénopathies unilatérales peu ou pas douloureuses chez un enfant présentant une bonne conservation de l'état général. Habituellement ces lésions tendent à se fistuliser. Parfois les adénopathies restent stables ou régressent spontanément. La guérison est habituellement spontanée, quoique des rechutes puissent être observées.

Trois espèces surtout sont en cause : *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii* et parfois *M. szulgai* et *M. fortuitum*.

C - Les tissus mous, la peau

Il s'agit d'ulcérations cutanées (*M. ulcérons*), de granulomes chroniques (*M. marinum*), d'abcès localisés secondaires à des injections médicamenteuses (*M. fortuitum-chelonae*). *M. haemophilum* et *M. szulgai* ont également été trouvés dans ces localisations.

D - Os et articulations

Les synoviales, les gaines de tendons, les bourses séreuses peuvent être infectées par *M. avium-intracellulare*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. szulgai* et les os par *M. fortuitum-chelonae*.

E - Maladie généralisée

Elle peut être observée chez des sujets immunodéprimés, notamment chez les malades atteints du SIDA. Les germes en cause sont surtout *M. avium-intracellulare*, parfois *M. kansasii*, *M. szulgai* et *M. xenopi*.

V - IDENTIFICATION DES MYCOBACTÉRIES AU LABORATOIRE

A - Mise en évidence du germe

Les techniques utilisées sont celles employées pour les bacilles de la tuberculose. Cependant, certaines mycobactéries (*M. fortuitum* et *M. chelonae*) sont très sensibles aux décontaminants habituellement utilisés.

Par ailleurs, la culture de *M. haemophilum* exige des milieux spéciaux : gélose chocolat ou milieux additionnés d'érythrocytes lysés ou de 0,4 % d'hémoglobine ou de 60 µM d'hémine ; ou milieu de Lôwenstein-Jensen additionné de 1 % de citrate ferri-ammoniacal.

La température d'incubation est en général de 37°C ; mais pour les produits du revêtement cutané ou d'origine superficielle, elle doit être à la fois de 30°C et de 37°C.

B - Tests d'identification des mycobactéries

1. *Vérifier que ce sont des bacilles acido-alcool-résistants.*

2. *Vérifier la pureté de la souche* car les associations de mycobactéries ne sont pas rares.

3. *Étudier la vitesse de croissance du germe* à diverses températures (28°C, 37°C, 42°C). La vitesse et la température optimale de croissance seront estimées sur une subculture de la souche présentant des colonies **isolées**.

4. *Observer l'aspect des colonies :*

- Colonies rugueuses R (ou eugoniques), comme *M. tuberculosis*.
- Colonies lisses S (smooth), comme *M. hovis*.
- Aspect intermédiaire.
- Pigmentation : colonies photochromogènes, scotochromogènes, non pigmentées.

La recherche d'une **pigmentation photo-inductible** doit s'effectuer de la manière suivante : une suspension de la souche à tester est diluée de façon à obtenir des colonies **isolées** sur 3 tubes de milieu à l'œuf. Deux de ces tubes sont enveloppés d'une feuille d'aluminium et le 3^e reste non protégé de la lumière. Quelques jours après l'apparition de colonies sur le tube non protégé, on contrôle la croissance de la mycobactérie dans les tubes enveloppés et l'un d'eux seulement est exposé pendant 5 heures à une lampe de 100 W après avoir décapuchonné le tube ou avoir desserré le capuchon à vis pour favoriser l'oxygénation de la culture.

Toutes les cultures sont remises à l'étuve, et l'apparition d'une éventuelle pigmentation s'observe après 24, 48 ou 72 heures.

5. Propriétés biochimiques

a/ Synthèse et libération d'acide nicotinique dans le milieu (niacin-test)

bl Étude d'activités enzymatiques : nitrate-réductase, catalase à 22°C, catalase à 68°C et à pH 7, arylsulfatase, hydrolyse du tween 80, uréase, pyrazinamidase, amidases, P-glucosidase, croissance en présence de fructose,...

6. Résistance à divers agents

NaCl 5 %, NaNO₂, TCH (hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique), Tbi (thiosemicarbazone), PAS, éthambutol, milieu de Mac Conkey sans cristal violet, acide paranitrobenzoïque, hydroxylamine, D-cyclosérine.

C - Identification proprement dite

1. Bactéries à croissance lente et photochromogènes (Tableau I)

Les études de photochromogénicité doivent être effectuées avec soin car elles sont importantes pour l'identification correcte de ces germes.

Les cultures à croissance confluyente ou les colonies vieilles peuvent ne pas produire de pigment après exposition à la lumière.

Ces bactéries ont une catalase thermostable.

Si l'activité catalasique de *M. kansasii* est élevée, le germe est réputé plus pathogène que s'il a une faible activité. A la coloration de Ziehl, il présente un aspect granuleux.

TABLEAU I
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION
DES ESPÈCES DE MYCOBACTÉRIES DU GROUPE I

		<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. simiae</i>
Température de croissance	30°C	+	+	+
	37°C	+	-	+
Hydrolyse du Tween 80	5 jours	+	+	-
	10 jours	+	+	
Croissance en présence de Tb ₁ *		-	+	+
Niadne		-	-/+	+
Nitrate réductase		+	+	-

* = thiosemicarbazone

2. Mycobactéries à croissance lente et scotochromogènes (Tableau II)

Ces bactéries ont une catalase thermostable.

M. szulgai est photochromogène à 24°C et scotochromogène à 37°C.

M. xenopi n'est souvent pigmenté qu'à la primoculture. Ce sont de petites colonies de longs bacilles. *M. xenopi* pousse plus vite à 42°C qu'à 37°C.

TABLEAU n
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION
DES ESPÈCES DE MYCOBACTÉRIES DU GROUPE n

	<i>M. flavescens</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. szulgai</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. xenopi</i>
Nitrate réductase	+	-	+	-	
Uréase	v	-	+	+	
Hydrolyse 5 jours du	+	+	-	-	
Tween50 10 jours	+	+	+	-	
Croissance sur gélose ordinaire	y	-	-	-	
Croissance sur Tbi*	+	+	+	v	+
Arylsulfatase	v	-	+	-	+
Bêta-glucosidase	v	-	+	-	v

v = variable

* = thiosemicarbazone

3. Bactéries à croissance lente et non pigmentées (Tableau III)

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. malmoense* et *M. gastri* ont une catalase thermolabile à 68°C.

M. ulcérons est isolé de lésions cutanées ou sous-cutanées. Il croît à 30°C en 6 à 9 semaines seulement.

M. malmoense résiste à l'INH, à la streptomycine, au PAS, et à la rifampicine.

M. haemophilum pousse à 30°C, requiert de l'hémine ou pousse sur milieu de Lôwenstein-Jensen contenant 1 % de citrate ferri-ammoniacal.

Autres bactéries sans intérêt clinique : mycobactéries du complexe « radish » ou « terrae » : ce groupe est sensible à l'éthambutol.

TABLEAUff
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES
ESPÈCES DE MYCOBACTÉRIES DU GROUPE m

	<i>M. avium- intracellulare</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. nonchro- mogenicum</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. triviale</i>
Hydrolyse 5 jours du	-	+/	-	+	+	+	+
Tween 80 10 jours	-	+	-	+	+	+	+
Nitrate réductase	-		-	.	.	v	+
Catalase thermo- stable	+	-	+	-	+	+	+
Arylsulfatase	-	-	-	-	+	-	+
Croissance sur Tb₁*	+	v	+	-	+	+	+
Croissance à 43°C	v	-	-	-	-	-	-
Uréase	-		+	.	.	-	-
Réduction tellurite (3 jours)	+		+	.	.	-	.

* = thiosemicarbazone

v = variable

4. Bactéries à croissance rapide (Tableau IV)

Elles forment des colonies en 5-7 jours et se développent sur les milieux bactériologiques usuels **géloses**.

al Mycobacteriumfortuitum-chelonae

Il s'agit de bactéries non pigmentées, croissant sur milieu de Mac Conkey sans cristal violet.

Parfois *M. fortuitum* absorbe le vert malachite et présente des colonies vertes sur milieu à base d'œuf.

bl Espèces pigmentées

Il en existe un grand nombre sans intérêt médical, mais parfois rencontrées au laboratoire d'analyse : *M. vaccae* (photochromogène), *M. aurum*, *M. parafortuitum*, *M. neoaurum*, etc.

cl Espèces thermophiles, plus ou moins pigmentées : *M. phlei*, *M. thermoresistibile*, *M. smegmatis* parfois utilisée comme stimulant non spécifique de l'immunité en cancérologie.

TABLEAU IV
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION
DES ESPÈCES DE MYCOBACTÉRIES DU GROUPE IV

	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	autres
Croissance sur Me Conkey sans cristal violet	+	+	-
Arylsulfatase 3 jours	+	+	-
Bêta-glucosidase	+	-	v
Pénicillinase	-	+	v
Capture du fer	+	-	v
Nitrate réductase	+	-	v

v = variable

5. Identification par sondes nucléiques

Des sondes nucléiques spécifiques permettent l'identification de certaines espèces de mycobactéries dites atypiques : *M. avium*, *intracellulare*, *M. kansasii* et *M. gordonae*. Les résultats obtenus sont très satisfaisants, mais ces sondes présentent encore le désavantage d'être radiomarquées.

VI - POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

- Le cobaye n'est pas sensible aux mycobactéries dites atypiques injectées par voie sous-cutanée.
- Le lapin et la poule **sont** sensibles à *M. avium* administré par **voie** intra-veineuse.
- La souris peut être utile mais n'est pas nécessaire pour différencier *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. ulcérons*. *M. kansasii* injectée par voie intra-veineuse chez cet animal produit une maladie des organes internes seulement. La queue et les coussinets plantaires, dont la température est inférieure à 37°C, restent indemnes. Les deux autres espèces, après injection intra-veineuse ou dans les coussinets plantaires, produisent des lésions dans les parties les plus froides du corps comme la queue, les coussinets plantaires, le nez, le scrotum etc.

M. ulcérons se développe très lentement par rapport à *M. marinum* mais provoque des lésions plus graves.

VII - LES SENSITINES

Les mécanismes de l'immunité et de l'hypersensibilité provoqués par les mycobactéries non tuberculeuses sont similaires à ceux de la tuberculose. Les sensitines sont des antigènes solubles dérivés de fractions cytoplasmiques après rupture de la paroi des bacilles.

Leur emploi est le même que celui de la tuberculine : déceler l'hypersensibilité retardée à une mycobactérie non tuberculeuse. Malheureusement il existe d'importantes réactions croisées entre les diverses sensitines, c'est-à-dire que l'infection par une mycobactérie donnée sera détectée par la sensitine homologue et par des sensitines provenant d'autres espèces de mycobactéries. Cependant la réaction homologue est en général plus importante que la réaction hétérologue, à condition d'utiliser des sensitines bien standardisées. Actuellement, on utilise des fractions purifiées de sensitines appelées PPD (« purified protein derivative »). Par exemple, dans le cas d'une infection à *M. avium-intracellulare* on effectuera en parallèle une intradermoréaction à la PPD-aviaire à un bras du malade et une autre à la PPD de la tuberculose à l'autre bras. On comparera les surfaces des deux réactions : la lecture devra être faite par deux observateurs au moins ; si la surface de la réaction à la PPD-aviaire est plus importante que celle de la réaction à la PPD de la tuberculose, on conclura à une infection par *M. avium-intracellulare*. En pratique, cette technique est utile chez de jeunes enfants n'ayant pas eu de contact avec d'autres antigènes mycobactériens, particulièrement dans le cas d'adénopathies. Chez l'homme adulte, la situation est plus complexe à envisager.

Les PPD sont fournies par le Statens Sérum Institut de Copenhague.

VIII - SÉROTYPIE DES MYCOBACTÉRIES DITES ATYPIQUES

Certaines espèces de mycobactéries comprennent divers sérotypes, ce qui présente un intérêt pour les études épidémiologiques.

M. avium-intracellulare possède 28 sérotypes (1 à 28)
(le sérotype 8 est le plus souvent rencontré chez l'homme)

M. scrofulaceum : 3 ou 4 sérotypes (41 à 43 ou 44)

M. marinum : 2 sérotypes (1 à 2)

M. fortuitum : 2 sérotypes (1 à 2)

M. gordonae : 7 sérotypes (1 à 7)

M. simiae : 1 sérotypes.

M. chelonae, *M. szulgai* et *M. kansasii* sont sérologiquement homogènes (un seul sérotype).

IX - THÉRAPEUTIQUE

La sensibilité des mycobactéries dites atypiques est habituellement évaluée par la méthode des proportions en milieu solide.

Les mycobactéries dites atypiques sont presque toujours résistantes au PAS et à l'INH, et beaucoup sont sensibles à la D-cyclosérine (sauf *M. szulgai* et *M. fortuitum-chelonae*). Cependant la sensibilité observée *in vitro* ne se traduit pas toujours *in vivo* par une efficacité du médicament ; les raisons en sont mal connues.

L'antibiogramme par la méthode radiométrique n'est pas applicable aux mycobactéries dites atypiques. De nombreux protocoles alternatifs sont en cours d'étude, visant à une standardisation de l'antibiogramme des mycobactéries non-tuberculeuses.

M. kansasii répond habituellement bien à des traitements adaptés. Il est sensible notamment à la thiosemicarbazone, à l'éthambutol, à l'éthionamide et à la rifampicine. Cependant *M. kansasii* apparaît à tort résistant à la rifampicine sur les antibiogrammes classiques où la rifampicine est remplacée par la rifamycine SV, plus stable, et ayant la même activité vis-à-vis de *M. tuberculosis*. Or *M. kansasii* est résistant vis-à-vis de la rifamycine SV ; il faut donc mesurer la sensibilité de ce germe à la rifampicine vraie sur un milieu préparé extemporanément.

M. marinum : les infections guérissent souvent spontanément mais lentement (plusieurs mois). On a utilisé avec succès dans le traitement : l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, des cyclines **ou** l'association rifampicine-éthambutol à laquelle le germe est souvent sensible *in vitro*.

M. avium-intracellulare, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai* et *M. simiae* sont habituellement multirésistants *in vitro* aux antibiotiques et répondent mal au traitement antibiotique. Pour les infections pulmonaires à *M. avium-intracellulare* on a proposé des associations incluant l'ansamycine (dérivé de la rifampicine) ou la D-cyclosérine. Le traitement chirurgical donnerait des résultats satisfaisants après stabilisation des lésions par un traitement antibiotique.

L'utilisation de clofazimine (anti-lépreux) de la clarithromycine et d'ansamycine a été préconisée dans les infections généralisées à *M. avium-intracellulare*.

Pour *M. fortuitum-chelonae*, l'amikacine, l'érythromycine, les cyclines, les sulfamides, l'éthionamide peuvent être efficaces.

BIBLIOGRAPHIE

COLLINS F.M., « Mycobacterial disease, immunosuppression and acquired immunodeficiency syndrome », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1989, 2, 360-377.

GROSSET J., « Les principes bactériologiques des traitements de la tuberculose », *Rev. Prat.*, 1979, 29, 2645-2650. Ce numéro est entièrement consacré à la tuberculose.

GROSSET J., « L'identification des mycobactéries », *Le technicien biologiste*, 1982, 8 (N° spécial), 47-52.

GROSSET J., JARLIER V., LECŒUR H., « La vaccination B.C.G. en France », *Rev. Mal. Resp.*, 1987, 4, 69-74.

GROSSET J., BOISVERT H., TRUFFOT-PERNOT Ch., « Mycobactéries », in *Bactériologie Médicale* 2^e édition (L. Le Minor et M. Véron éd.), 1989, pp 965-999, Flammarion Médecine Sciences, Paris.

KIEHN T.E., EDWARDS F.F., BRANNON P., et al., « Infections caused by *Mycobacterium avium* complex in immuno-compromised patients », *J. Clin. Microb.*, 1985, 21, 168-173.

SOMMERS H.M., GOOD R.C., « *Mycobacterium* », in *Manual of Clinical Microbiology* (E.H. Lennette and coll. éd.), 4th édition, 1985, 216-248, ASM, Washington D.C.

WOLINSKY E., « Non-tuberculous *Mycobacterla* and associated diseases », *Ann. Rev. Resp. Dis.*, 1979, 119, 107-159.

A signaler : Les mycobactéries atypiques et leur pathologie. Médecine et Maladies Infectieuses, 1991, 21, Numéro spécial.

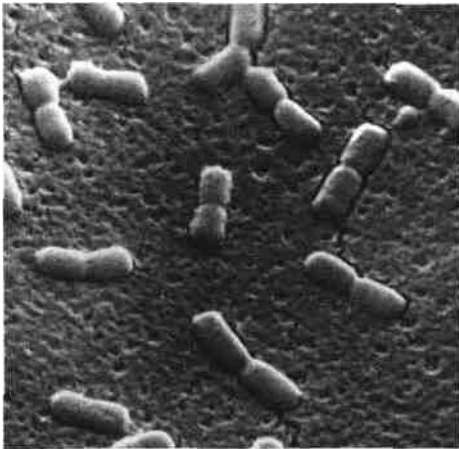
Chapitre XXXV

MYCOBACTERIUM LEPRÆ

La lèpre affecte plus de dix millions d'individus résidant le plus souvent dans les pays en voie de développement de la zone intertropicale. En Asie se trouvent 62 % des lépreux et en Afrique 34 %, mais la prévalence de la maladie est 3 fois plus élevée en Afrique qu'en Asie.

LE GERME

A - Description



L'agent étiologique de la maladie est *Mycobacterium leprae* (ou bacille de Hansen, 1873) qui est un germe faiblement acido-alcool-résistant ; il est beaucoup plus facilement décolorable par les acides et l'alcool que *M. tuberculosis*. **Il n'est pas cultivable.**

Il s'agit d'un bacille de 1 à 8 μm de long et de 0,3 à 0,5 μm de large, à bords parallèles et à extrémités arrondies, coloré de façon homogène ; il est immobile.

Dans les tissus les bacilles se groupent en globi ou en groupes de bacilles rangés côte à côte.

B - Caractères biochimiques

Les bacilles de Hansen récoltés à partir de tissus humains ou du tatou possèdent des cytochromes, une NADH-réductase, une phosphatase alcaline et une enzyme spécifique de *M. leprae*, la diphénol oxydase susceptible d'oxyder la D-DOPA. Ils oxydent le glucose en CO_2 possèdent les composants du cycle de Krebs et sont capables de produire leur propre énergie. Ils contiennent une superoxyde dismutase, mais pas de catalase. Les conditions physicochimiques optimales favorisant leur métabolisme sont une température de 33°C et un pH acide (5,6).

II - POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Le bacille peut se multiplier dans les coussinets plantaires de la souris (surtout souris Swiss G) ou du hamster. Dans ces conditions de culture *in vivo*, leur temps de génération est de 20 à 30 jours. Les germes n'envahissent pas les tissus profonds et leur multiplication peut être inhibée par divers médicaments (sulfones par exemple). Après inoculation de 10^3 germes, le nombre de bacilles croît lentement en 6 à 9 mois pour atteindre le chiffre maximum de 10^6 bacilles, puis reste stationnaire.

La transmission du germe à des souris immunodéprimées (souris "nude" athymiques) réalise un modèle d'infection ressemblant à la lèpre lépromateuse et l'on peut obtenir 10^{10} à 10^{11} germes dans les coussinets plantaires.

M. leprae peut se développer aussi chez le tatou à neuf bandes ou armadillo (*Dasypus novemcinctus*) produisant une maladie analogue à la lèpre lépromateuse humaine. Chez cet animal beaucoup d'organes sont atteints (particulièrement le foie et la rate) et contiennent de nombreux bacilles. L'inoculation intradermique ou intraveineuse produit la maladie chez la moitié des animaux après 18 à 24 mois d'incubation. D'autres espèces de tatous sont plus ou moins sensibles à *M. leprae*.

Les singes Mangabey peuvent être naturellement infectés par *M. leprae* et la lèpre a également été transmise expérimentalement au singe Rhésus.

III - ÉPIDÉMIOLOGIE

La lèpre est une maladie qui se transmet d'homme à homme.

L'endémie lépreuse sévit dans tous les pays de la zone intertropicale : Asie des moussons, Océanie, Afrique, Amérique latine ; en Europe subsistent des foyers islandais, baltes et portugais.

La lèpre, qui était fréquente en Europe au Moyen-Age, en a quasiment disparu pour des raisons non entièrement élucidées.

En France on n'observe que des cas importés, particulièrement chez des Antillais, Africains et Portugais.

Il semble qu'une infection inapparente intervienne fréquemment chez des sujets neufs arrivant en zone d'endémie lépreuse et que le contact intense avec le bacille déprime la résistance à *M. leprae*. On estime que sur 200 personnes infectées par *M. leprae*, une seule présentera une lèpre cliniquement patente.

Dans 40 à 50 % des cas, la lèpre se contracte avant l'âge de 20 ans. La contamination s'effectue par voie cutanée ou muqueuse, à partir du mucus nasal des sujets atteints de lèpre lépromateuse. Elle pourrait également se transmettre lors de ruptures de la barrière cutanée et on a incriminé les arthropodes comme agents favorisant l'extension de la maladie. La phase d'incubation est comprise entre quelques mois et 10 ans. Les facteurs favorisant l'extension de la maladie sont les mauvaises conditions d'hygiène, la promiscuité, la malnutrition et le climat tropical.

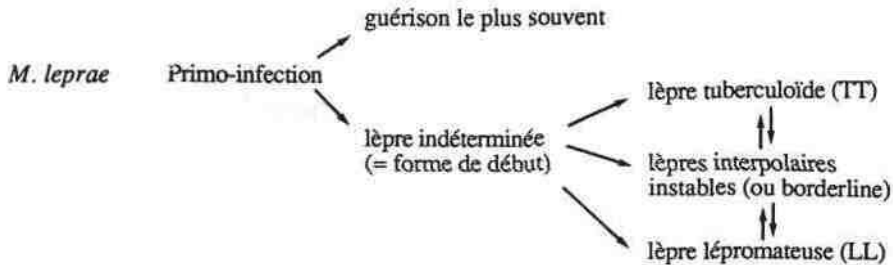
IV - POUVOIR PATHOGÈNE CHEZ L'HOMME

Mycobacterium leprae est un parasite intra-cellulaire strict de l'homme que l'on retrouve surtout au niveau de la peau glabre (surfaces convexes exposées) et des nerfs périphériques.

A - Aspect clinique

Les signes cliniques observés dans la lèpre résultent de la prolifération bactérienne, de la réponse immunitaire du sujet infecté et de la névrite périphérique liée aux deux processus précédents. La lèpre touche toujours les nerfs périphériques, presque toujours la peau et souvent les muqueuses. Les 3 signes cardinaux de la lèpre sont les lésions cutanées, l'anesthésie cutanée et les gros nerfs périphériques.

La lèpre présente un polymorphisme clinique complexe. Le passage d'une forme de lèpre à l'autre se fait soit spontanément, soit sous l'influence du traitement. Les formes « polaires », c'est-à-dire tuberculoïdes et lépromateuses, sont les formes spontanément les plus stables.



1. Lèpre indéterminée

Il s'agit d'une forme de début comportant une ou plusieurs macules hypopigmentées et hypoesthésiques. Elle évolue vers la guérison dans 3/4 des cas. Elle peut rester également longtemps sous forme indéterminée ou évoluer vers l'une des 3 formes cliniques décrites ci-après.

2. Lèpre tuberculoïde (TT)

Il s'agit d'une forme localisée **abacillaire ou pauci-bacillaire** en raison d'une immunité à médiation cellulaire efficace. C'est une maladie cutanée et nerveuse, parfois uniquement nerveuse. Cette forme a une certaine stabilité.

al Léprides tuberculoïdes

Ce sont des lésions cutanées en placards, rares, à bords nets, superficielles, décolorées, présentant des troubles sensitifs globaux et des troubles vaso-moteurs (pêne de la sudation). Ce sont, soit de simples macules, soit des plaques plus étendues à bord saillant (= zone d'extension).

bl Atteinte nerveuse : très marquée

Elle touche le plexus cervical superficiel, le nerf cubital au pli du coude, le nerf médian (avant-bras) et le nerf sciatique poplité externe au niveau de la tête du péroné.

Les nerfs sont hypertrophiés, irréguliers, moniliformes, entraînant des atrophies musculaires. Ainsi se créent la griffe cubitale et le pied tombant paralytique.

Par ailleurs s'ajoutent des troubles sensitifs des extrémités des membres : anesthésie distale globale, zones de dissociation thermo-algésique (anesthésie d'abord thermique, puis à la douleur).

L'abolition de la sensation de douleur permet au malade d'utiliser une extrémité blessée ou infectée. Il en résulte des ostéomyélites de surinfection, des destructions osseuses septiques avec déformations secondaires. Ces troubles aboutissent à la grande lèpre mutilante.

3. Lèpre lépromateuse (LL)

C'est une maladie générale, **hautement bacillifère** ; le système cellulaire de défense immunitaire est atteint. C'est une forme ayant une certaine stabilité clinique. Les lésions observées résultent d'une accumulation de bacilles et de macrophages.

al Lésions cutanées : c'est l'atteinte principale

- lépromes circonscrits ou tubéreux : ce sont des nodules plus ou moins volumineux faisant saillie sous la peau. Ils sont noyés dans une réaction inflammatoire et siègent à la face (surtout hélix de l'oreille et ailes du nez) et sont accompagnés de la chute de la barbe et de la queue des sourcils, réalisant le « faciès léonin ». Les membres supérieurs et inférieurs sont aussi atteints
- lépromes en nappe ou léprides lépromateuses : ils siègent surtout au niveau du tronc.
Si le traitement est institué précocement, ces lésions ne sont pas mutilantes et régressent sans séquelles. Par contre ces lésions deviennent mutilantes lors de réactions lépreuses (cf. ci-dessous) ou lorsque le traitement est institué tardivement. Ces lésions contiennent un très grand nombre de bacilles (10^{10} ou davantage par gramme de tissu)

bl Atteinte muqueuse :

La rhinite lépromateuse est la principale lésion ; le jetage purulent est riche en bacilles et joue un rôle dans la propagation de la maladie ; la muqueuse laryngée et la cornée (surtout le tiers antérieur du globe oculaire, de température plus basse) peuvent aussi être touchées.

cl Autres organes atteints :

On note une hypertrophie des nerfs périphériques, des ganglions lymphatiques, de la rate et des testicules. Les cellules de Kupffer du foie sont remplies de bacilles en globi.

Un syndrome inflammatoire biologique accompagne cette forme de lèpre.

Ces différentes lésions contribuent à la dissémination bacillaire.

L'évolution vers la mon se réalise en 5 à 6 ans par cachexie, amylose viscérale ou d'autres affections intercurrentes.

L'arrêt ou la reprise brutale du traitement antibactérien peuvent conduire au développement d'accidents allergiques complexes de type phénomène d'Arthus et appelés fièvre de réaction ou réaction lépreuse. Ils se traduisent par divers symptômes comme un érythème noueux, une exacerbation des lésions ou de la fièvre.

On nomme réaction réverse une augmentation du niveau d'hypersensibilité retardée spécifique, ce qui conduit à une réaction inflammatoire, à des névrites et à la compression des nerfs au niveau des gouttières osseuses. Ceci nécessite une chirurgie spécifique. Ces réactions immunologiques compromettent la poursuite du traitement spécifique antilépreux.

4. *Lèpres interpolaires (ou intermédiaires)*

Ce sont des lèpres à système immunitaire instable, à évolution polymorphe et qui jouent un rôle dans l'épidémiologie car leur caractère bacillifère est souvent méconnu. On distingue :

La lèpre interpolaire tuberculoïde (BT). Elle ressemble à la lèpre tuberculoïde. Le nombre de lésions cutanées est plus important et les bords de ces lésions sont moins nets et parfois entourés de lésions satellites. Ces dommages nerveux sont plus diffus que dans la lèpre tuberculoïde.

La lèpre interpolaire lépromateuse (BL). Elle ressemble à la lèpre lépromateuse, mais toutes les lésions cutanées ne sont pas anesthésiques. En outre certaines présentent un bord franc. Les troncs des nerfs périphériques sont plus atteints que dans la lèpre lépromateuse.

B - Physiopathologie

Deux mécanismes immunitaires opposés conditionnent les formes cliniques et l'évolution de la maladie.

1. *Immunité tissulaire*

La réaction à la lépromine (Mitsuda, 1919) correspond à l'injection intradermique d'une suspension autoclavée de bacilles lépreux obtenus de lépromes (= lépromine).

Deux types de réponses sont individualisés :

- une réponse précoce (48-72^e heure) appelée réaction de Fernandez : il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité retardée, mal corrélée à la forme de la maladie,

- une réaction tardive (21-28^e jour) appelée réaction de Mitsuda (lèpre tuberculoïde). On observe l'apparition d'un granulome qui reflète alors réellement l'état de résistance du sujet et est bien corrélé à la forme de la maladie. Par biopsie de ce granulome on retrouve histologiquement la forme de la maladie.

a) En milieu lépreux

Lèpre lépromateuse : réaction de Mitsuda négative,
 Lèpre tuberculoïde : réaction de Mitsuda positive (plus de 5 mm de diamètre),
 Lèpre intermédiaire : réaction de Mitsuda douteuse ou négative,

Les sujets indemnes de lèpre en milieu lépreux ont une réaction de Mitsuda positive car ces sujets font une primo-infection qui guérit le plus souvent spontanément.

b) En milieu non lépreux

Sujets tuberculeux ou vaccinés par le B.C.G. : réaction de Mitsuda parfois positive.

Sujets indemnes de toute agression bactérienne : réaction de Mitsuda négative.

Ainsi il existe un déficit spécifique de l'immunité cellulaire vis-à-vis de *M. leprae* et une baisse modeste du niveau général de l'immunité cellulaire dans la lèpre lépromateuse ; par ailleurs, dans la lèpre tuberculoïde, l'absence de corrélation existant entre la réaction de Fernandez (réaction d'hypersensibilité retardée) et la réaction de Mitsuda (test d'immunité) montre que ces deux types de réactions immunologiques sont dissociés.

La réaction de Mitsuda n'a **aucun intérêt diagnostique** (car elle est positive chez les sujets-contact), mais elle contribue à la classification du cas observé, et donc au pronostic.

2. Immunité humorale

Cette immunité peut être mise en évidence par la réaction d'immunofluorescence de Merklen-Cottenot réalisée avec le bacille de Stefansky (*Mycobacterium lepraemurium*). Des sujets sains ou tuberculeux peuvent présenter des réactions positives. C'est pourquoi les sérums des malades doivent être absorbés par le B.C.G. et *Mycobacterium vaccae* pour augmenter la spécificité de la réaction. Les résultats obtenus varient selon le type de lèpre :

Lèpre lépromateuse	jusqu'au 1/1024
Lèpre tuberculoïde	1/128 à 1/256
Lèpre traitée	1/32 à 1/128
Sujets sains	moins de 1/32.

Tout se passe comme si le taux des anticorps circulants était proportionnel au nombre des bacilles. Ces anticorps circulants ne sont pas protecteurs, mais plutôt responsables d'accidents allergiques liés à un phénomène d'Arthus comme l'atteinte rénale ou comme l'érythème noueux lépreux.

Des antigènes spécifiques de *M. leprae* ont été caractérisés. Ils pourraient permettre le diagnostic sérologique de certaines formes de lèpre.

V - DIAGNOSTIC DE LA LÈPRE

1. *Formes bacillaires (lépromateuses)*

Les bacilles sont faciles à mettre en évidence dans le mucus nasal et dans le suc dermique prélevé au niveau des lépromes (dos, bras, cuisses, lobe de l'oreille).

L'identification bactériologique du germe repose sur 3 critères :

- coloration acido-alcool-résistante,
- impossibilité de cultiver le germe sur des milieux bactériologiques,
- possibilité de multiplication limitée dans le coussinet plantaire de la souris.

On utilise la coloration de Ziehl-Neelsen à froid. La coloration à la fuchsine doit être longue (20 mn), mais la décoloration doit être brève (quelques secondes) en raison de la faible acido-alcool-résistance du germe.

On distingue :

- un *indice bactériologique* coté de 1+ à 6+ selon la richesse bacillaire par champ microscopique.

Plus cet indice est élevé, plus la lèpre est évolutive. La régression de cet indice sous traitement, même efficace, est toujours lente.

- un *indice morphologique* : certains bacilles sont uniformément colorés ; d'autres se teignent irrégulièrement à la fuchsine ou même sont franchement granuleux. Les premiers sont considérés comme vivants, les autres comme morts. L'indice morphologique représente le pourcentage de bacilles uniformément colorés. Cet indice morphologique est élevé dans la lèpre évolutive non traitée, mais dépasse rarement 50.

Cet indice diminue rapidement sous traitement efficace ; il est donc l'indice essentiel de surveillance de l'efficacité thérapeutique.

La technique de coloration à l'auramine peut être utilisée dans le dépistage de la lèpre ; les bacilles sont petits et groupés en globi.

2. *Formes cutané-nerveuses (tuberculoïdes)*

Les signes cliniques suspects sont les suivants : nodules cutanés, gros nerfs, troubles de la sensibilité au chaud et au froid, troubles vasomoteurs.

On ne met pas en évidence de bacilles de Hansen dans la muqueuse nasale ni dans les biopsies de lésions cutanées. Le diagnostic différentiel est difficile avec certaines acropathies nerveuses : diabète, maladie de Thévenard, pseudo-lèpre bretonne de Bureau et Barrière, para-amyloïdose portugaise.

3. *Histopathologie*

Le diagnostic positif est assuré par la biopsie cutanée profonde faite en périphérie de la lésion cutanée suspecte. Dans les formes sans atteinte cutanée on effectuera des biopsies de nerfs ou de ganglions.

L'étude histologique est donc un complément indispensable au diagnostic et permet la classification de la forme de lèpre.

- Lèpre indéterminée : infiltrats lympho-histiocytaires indifférenciés siégeant dans le derme et ayant une affinité pour les nerfs.
- Lèpre tuberculoïde : infiltrat épithélioïde et/ou giganto-cellulaire du derme superficiel et de la couche basale de l'épiderme avec atteinte en profondeur des annexes cutanées (glandes sudoripares, glandes sébacées) et des nerfs.
- Lèpre lépromateuse : présence de granulomes macrophagiques et de grandes cellules vacuolisées contenant des globi bacillaires (cellules de Virchow). Ces nombreuses cellules sont séparées de l'épiderme par une zone claire. Les nerfs présentent des lésions dégénératives.

- Lèpre interpolaire tuberculoïde : l'infiltrat est souvent analogue à celui observé dans la lèpre tuberculoïde, mais il n'englobe pas la couche basale de l'épidémie.
- La lèpre interpolaire lépromateuse : on observe de nombreux macrophages associés à des lymphocytes. Le nombre de bacilles observés est plus faible que dans la forme lépromateuse.

4. Amplification génique *in vitro* (PCR)

Cette méthodologie pourrait devenir un outil sensible et plus performant que l'examen microscopique pour le diagnostic de la lèpre, comme l'ont montré des études préliminaires réalisées sur des biopsies congelées ou fixées au formol.

VI - TRAITEMENT

A - Traitement curatif

1. Les médicaments

a/ La dapsone (ou diaminodiphénylsulfone ou D.D.S. ou sulfone-mère)
Dans certains régions du monde, 50 % des souches résistent aux sulfones.

bl La clofazimine (Lamprène®)

Cette substance est utile pour les formes réactionnelles : mais colore les téguments en jaune-orangé.

cl La rifampicine

Elle est très active dans les formes hautement bacillifères (beaucoup plus active que les sulfones), mais son prix de revient est élevé.

dl Les thioéthers (éthionamide ou prothionamide)

et La clarithromycine pourrait être également utilisée dans l'avenir.

2. Antibiogramme

Un « antibiogramme *in vivo* » peut être réalisé sur *Mycobacterium leprae* par injection des bacilles dans les coussinets plantaires de souris traitées ou non par des antibiotiques et par comparaison des indices bactériologiques et morphologiques entre eux. Cette technique est aussi utilisée pour déterminer si deux antibiotiques sont synergiques ou antagonistes entre eux.

3. Réalisation du traitement

De nombreux schémas thérapeutiques sont préconisés actuellement. Celui préconisé par l'Organisation Mondiale de la Santé est le suivant :

al Formes bacillaires

Pour réduire les résistances, l'emploi d'une polychimiothérapie est recommandé actuellement.

Elles seront traitées pendant au moins 2 ans par une chimiothérapie triple comportant chaque jour 100 mg de sulfone et 50 mg de clofazimine et, chaque mois,

600 mg de rifampicine et 300 mg de clofazimine. Le traitement doit être poursuivi jusqu'à ne plus détecter de germes dans les frottis de pulpe dermique.

bl Formes paucibacillaires ou abacillaires

Elles seront traitées pendant 6 mois par une prise quotidienne de 100 mg de sulfone et une prise mensuelle de 600 mg de rifampicine.

cl Traitements immunostimulants

- B.C.G. itératifs : deux ans d'injections bimensuelles, conduisant à des séquelles cutanées.

dl Réactions lépreuses : traitement antiinflammatoire

Il faut lutter contre les phénomènes allergiques :

- le phénomène d'Arthus (érythème noueux associé à de la fièvre, des arthralgies, une orchite ou une iridocyclite) est traité par la thalidomide, éventuellement par un collyre aux stéroïdes.
- la réaction réverse, fréquente dans certaines formes interpolaires sous traitement, nécessite l'emploi de corticoïdes et la réduction ou l'interruption de la chimiothérapie spécifique en raison du risque névritique. On peut cependant augmenter les doses de clofazimine en raison de leur action antibacillaire et antiinflammatoire.

el Prévention des surinfections des extrémités anesthésiées

Les extrémités blessées ou infectées seront immobilisées par des attelles jusqu'à guérison complète afin de prévenir les ostéomyélites de surinfection.

// Traitement des séquelles

Chirurgie de libération nerveuse, sympathectomie, orthopédie, rééducation.

B - Traitement prophylactique

- Dépistage scolaire permettant la détection de la lèpre avant l'apparition de lésions irréversibles.
- B.C.G. associé à une chimioprophylaxie à base de sulfone chez les enfants en milieu lépreux ; l'efficacité du B.C.G. seul est encore controversée.
- La recherche d'anticorps sériques contre un glycolipide phénolique spécifique de *M. leprae* devrait permettre un diagnostic précoce des sujets encore en période d'incubation lépreuse. Ces sujets pourraient ainsi bénéficier d'un traitement préventif de la maladie.
- Un vaccin constitué de *M. leprae* tué par chauffage après avoir été prélevé chez le tatou est en cours d'expérimentation au Malawi. L'association du B.C.G. à ce vaccin est aussi en cours d'évaluation.

BIBLIOGRAPHIE

BASSET A., « Quand penser à une lèpre ? », *Rev. Prat.*, 1978, **28**, 3625-3640.

HASTINGS R.C., GILLIS T.P., KRAHENBUHL J.L., FRANZBLAU S.G., « Leprosy », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988,**1**, 330-348.

LAGRANGE P., BARANTON G., « *Mycobacterium leprae* », in *Bactériologie médicale*, 2^e édition, L. Le Minor et M. Véron éd., 1989, Flammarion Médecine Sciences, Paris, 999-1019.

MAURICE J., La lèpre. *La Recherche*, 1987,**18**, 983-995.

OMS Comité d'experts de la lèpre. Série des rapports techniques n° 607, Genève, 1977 ; Série des rapports techniques n° 675, Genève, 1982.

SECTION DC — SPIROCHETES

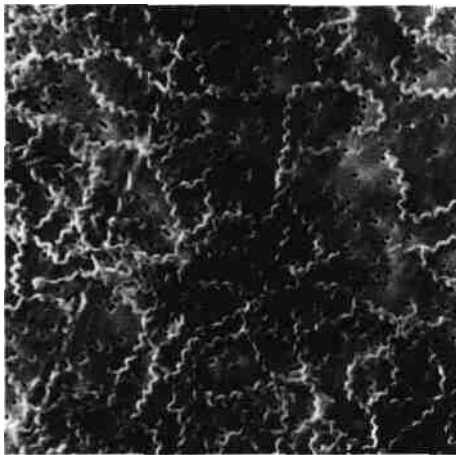
GENERALITES SUR LES SPIROCHETES

1 - STRUCTURE

SCHÉMA D'UN SPIROCHÈTE



Le pointillé représente l'enveloppe. Le cylindre protoplasmique est tracé en trait plein. Les cercles situés près des extrémités sont les points d'insertion des flagelles périplasmiques.



Les bactéries appartenant à l'ordre des *Spirochaetales* sont souples, caractérisées par leur **forme hélicoïdale** et leur mobilité est due à un appareil locomoteur interne. Elles mesurent de 5 à 250 μm de longueur et de 0,1 à 30 μm d'épaisseur.

Les spirochètes sont pourvus d'une **enveloppe** qui entoure complètement le cylindre protoplasmique constitué du cytoplasme et de l'appareil nucléaire. Cette enveloppe a une structure voisine de celle de la paroi des bacilles à Gram négatif. Le cylindre protoplasmique est lui-même limité par une membrane protoplasmique.

L'**organe locomoteur interne** (encore appelé flagelles périplasmiques ou fibrilles axiales) est situé entre l'enveloppe et le cylindre protoplasmique. Le nombre des flagelles varie selon les espèces de 2 à plus de 100 par corps bactérien. Chaque flagelle est inséré par l'une de ses extrémités à un corpuscule basal intracytoplasmique situé à un pôle du cylindre protoplasmique. Leur structure s'apparente à celle des flagelles bactériens. Mais la situation endocellulaire de ces flagelles permet aux spirochètes de rester mobiles dans un milieu à forte viscosité qui immobilise les autres bactéries flagellées.

Lorsqu'ils sont observés au microscope à fond noir, les spirochètes sont animés de mouvements caractéristiques : déplacements, flexions, mouvements en tire-bouchon autour de leur axe.

Certains spirochètes n'ont jamais pu être cultivés *in vitro*. Quant à ceux qui sont cultivables, il en est qui sont anaérobies et d'autres aérobies.

II - CLASSIFICATION ET NOMENCLATURE

Les bactéries de l'ordre des *Spirochaetales* sont classées en deux familles :

- la famille des *Spirochaetaceae* regroupe quatre genres : *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* et *Borrelia*,
- la famille des *Leptospiraceae* n'est constituée que d'un seul genre, *Leptospira*.

III - HABITAT ET POUVOIR PATHOGÈNE

Les Spirochètes sont très répandus dans la nature et trouvés dans les eaux douées.

Trois genres ont un pouvoir pathogène pour l'homme :

- le genre *Treponema*, responsable de la syphilis et des autres tréponématoses, non vénériennes,
- le genre *Leptospira*, agent des leptospiroses,
- le genre *Borrelia*, agent de fièvres récurrentes transmises par des arthropodes.

Chapitre XXXVI LES TRÉPONÈMES

Les tréponèmes appartiennent à l'ordre des *Spirochætales* dont ils ont tous les caractères généraux décrits ci-dessus. Il existe de nombreuses espèces de tréponèmes qui sont saprophytes des muqueuses. Contrairement à la plupart des espèces saprophytes, les tréponèmes pathogènes pour l'homme ne sont pas cultivables *in vitro*. Trois espèces sont pathogènes pour l'homme, ce sont :

- *Treponema pallidum*, agent de la syphilis vénérienne et de la syphilis endémique non vénérienne ou bejel.
- *Treponema pertenue*, agent du pian.
- *Treponema carateum*, agent de la pinta ou caraté.

TREPONEMA PALLIDUM

Treponema pallidum, ou tréponème pâle, est l'agent de la syphilis, maladie strictement humaine, à transmission presque toujours vénérienne. Cette bactérie a été reconnue en 1905 par Schaudinn. La réaction de fixation du Complément décrite par Bordet a été appliquée en 1906 par Wassermann au diagnostic sérologique de la syphilis.

1 - ÉPIDÉMIOLOGIE

Plusieurs théories existent sur l'origine de la syphilis. Selon une théorie ancienne, la syphilis aurait été importée en Europe au XV^e siècle par les marins de Christophe Colomb. Une autre théorie prétend que la maladie existait déjà dès l'antiquité. Quoi qu'il en soit, la syphilis est aujourd'hui une maladie disséminée dans le monde entier.

La transmission de la syphilis se fait presque toujours par **contact direct vénérien** : chancres génitaux, anaux ou accessoirement buccaux. Les tréponèmes sont très nombreux dans les lésions cutanées et muqueuses. Leur vitalité est

extrêmement faible en dehors de l'organisme humain, ce qui rend inexistant le risque de transmission par des objets potentiellement contaminés. La transfusion du sang d'un donneur atteint de syphilis primo-secondaire peut transmettre la maladie, ce qui impose un dépistage sérologique de la syphilis chez tout donneur de sang.

Le nombre de cas de syphilis primo-secondaire avait fortement diminué à cause de l'efficacité de la pénicilline. Depuis quelques années on assiste à une recrudescence de la maladie due à plusieurs facteurs : migrations humaines, tourisme exotique, libération des mœurs, homosexualité. Environ 4 000 nouveaux cas étaient déclarés en France chaque année aux autorités sanitaires. Aujourd'hui la syphilis n'est plus une maladie à déclaration obligatoire.

II - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Après la contamination, l'incubation de la syphilis, de trois semaines en moyenne, est entièrement silencieuse.

- *Syphilis primaire*

» La première manifestation clinique est le chancre, ulcération indolore à base indurée, siégeant au point d'inoculation et accompagnée de son adénopathie satellite. Non traité, le chancre guérit spontanément en 4 à 6 semaines avec ou sans cicatrice.

- *Syphilis secondaire*

Cette phase débute environ deux mois après le contagion. Elle est caractérisée par des lésions cutanées et muqueuses : roséole suivie de syphilides, plaques muqueuses, condylomes, alopecie, atteinte des ongles, etc... Ces lésions, dues à une dissémination des tréponèmes par voie sanguine et lymphatique, sont très contagieuses. Elles peuvent être accompagnées d'un syndrome infectieux et de polyadénopathies. Ces signes disparaissent spontanément en un à deux ans.

- *Syphilis latente*

Lorsque les signes de la période secondaire ont disparu, la syphilis est totalement asymptomatique et non contagieuse. Le diagnostic ne peut être fait que par des examens sérologiques. La syphilis latente dure plusieurs années ou même plusieurs dizaines d'années, le malade pouvant mourir d'une autre maladie.

- *Syphilis tertiaire*

Après ces années, chez certains malades apparaissent des lésions graves de syphilis tertiaire. Ce sont des lésions cardio-vasculaires (aortite, anévrysme de l'aorte), cutanées (gommès), ou neurologiques (tabès, paralysie générale).

- *Syphilis congénitale*

La syphilis peut être transmise à son fœtus par une mère atteinte de syphilis évolutive. Le passage transplacentaire de *T. pallidum* entraîne une atteinte septicémique du fœtus responsable soit de la mort fœtale, soit des manifestations cliniques de la syphilis congénitale.

- *Syphilis endémique ou bejel*

Elle s'observe en Afrique et aux Antilles. La contamination est non vénérienne. Elle se fait souvent dans l'enfance au contact de lésions contagieuses. La syphilis endémique ne se complique pas de localisations viscérales tardives.

III - POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL

Bien que la syphilis soit une maladie strictement humaine, il est possible de provoquer une infection expérimentale chez l'animal. Le chimpanzé développe une

maladie qui se rapproche de la syphilis de l'homme. Le lapin est l'animal le plus utilisé. Il peut être inoculé par voie oculaire, sous-cutanée ou intra-testiculaire.

L'injection intra-testiculaire de *T. pallidum* à un lapin provoque en quelques jours une orchite riche en tréponèmes. La souche Nichols, isolée en 1912 d'un L.C.R., est régulièrement entretenue par passages successifs dans les testicules de lapin. Elle est utilisée pour réaliser le test de Nelson.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie et vitalité

La morphologie de *T. pallidum* est décrite ci-dessous. Se reporter au « Diagnostic bactériologique direct ».

Non cultivable *in vitro*, *T. pallidum* peut néanmoins être recueilli en quantité importante de l'orchite expérimentale du lapin. Sa vitalité hors de l'organisme est extrêmement faible. Néanmoins *in vitro* les tréponèmes peuvent être maintenus mobiles et pathogènes pendant plusieurs jours dans le milieu de survie décrit par Nelson.

T. pallidum est très sensible à l'action des antiseptiques.

B - Structure antigénique

T. pallidum a une structure complexe. Quatre groupes d'antigènes ont été mis en évidence.

1. *Le cardiolipide ou haptène lipidique de Wassermann*

C'est un phosphatidyl-glycérol commun à tous les tréponèmes et retrouvé dans les tissus animaux. Le cœur et le foie en sont particulièrement riches. L'infection syphilitique provoque un remaniement tissulaire au niveau des lésions. Associé à des protéines du tréponème, cet haptène devient antigénique. Les anticorps correspondants sont dénommés réagines.

2. *Un antigène protéique spécifique de groupe*

Il est commun à tous les tréponèmes, pathogènes ou non, et porté par les fibrilles. Cet antigène, extrait du tréponème de Reiter, peut être utilisé en réaction de fixation du Complément.

3. *Un antigène polysidique d'enveloppe*

Il est spécifique de *T. pallidum* et suscite la formation d'anticorps réagissant en immunofluorescence.

4. *Des antigènes du corps tréponémique*

Leur nature est mal connue. Ils suscitent la formation d'anticorps très spécifiques de *T. pallidum* qui interviennent dans le test de Nelson.

C - Immunité

L'infection naturelle ou expérimentale par *T. pallidum* entraîne **une réaction** immune à médiation à la fois cellulaire et humorale.

Pendant que l'infection évolue, il existe une immunité de surinfection protégeant contre une nouvelle contamination. Les anticorps élaborés ne sont pas suffisants pour éliminer les tréponèmes et empêcher la maladie de progresser.

Un sujet traité efficacement peut à nouveau contracter la syphilis. La présence résiduelle d'anticorps ne protège pas contre une réinfection.

Il n'existe pas de vaccin contre la syphilis.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DIRECT DE LA SYPHILIS

C'est dans les lésions de syphilis primaires et secondaires (chancres, ganglions satellites, plaques muqueuses) ou celles de la syphilis congénitale (phemphigus, coryza) que *T. pallidum* peut être retrouvé. Cette recherche doit être faite sur toute érosion ou ulcération génitale suspecte, avant tout traitement antibiotique et avant toute application d'antiseptique sur les lésions.

La mise en évidence de *T. pallidum* se fait uniquement par examen microscopique puisque cette bactérie ne se développe pas *in vitro*.

A - Examen au microscope à fond noir ou ultramicroscope

A cause de la très grande fragilité de la bactérie, le prélèvement de sérosité effectué à l'aide d'un vaccinostyle ou d'une pipette est fait au laboratoire. La sérosité recueillie est déposée sur une lame, recouverte d'une lamelle et examinée **immédiatement** au microscope à fond noir.

T. pallidum apparaît comme une bactérie fine, hélicoïdale, à spires régulières et serrées au nombre de 6 à 12 et dont les extrémités sont effilées. Sa longueur est d'environ 10 (J.m et son épaisseur de 0,2 [m]. La bactérie a une faible réfringence ; sa couleur pâle (pallidum) contraste avec le fond noir.

La **mobilité** de *T. pallidum* est caractéristique. Trois sortes de mouvements sont généralement combinés :

- un mouvement en pas de vis, de rotation sur son axe,
- un mouvement pendulaire,
- un mouvement ondulatoire qui se propage d'une extrémité à l'autre du corps bactérien.

Mais seul un observateur entraîné peut distinguer *T. pallidum* des autres tréponèmes commensaux des muqueuses génitales.

Une recherche négative de *T. pallidum* n'élimine pas à elle seule le diagnostic de syphilis et il peut être utile de répéter l'examen.

B - Examen après coloration

Après fixation de l'échantillon sur une lame, l'utilisation de colorant permet d'épaissir le corps bactérien et de le rendre visible au microscope ordinaire. La coloration de Vago (violet de méthyle) et celle de Fontana-Tribondeau (sels d'argent) ont pour inconvénient de déformer le corps bactérien et de faire perdre à *T. pallidum* sa morphologie caractéristique. De plus, il n'est pas possible d'observer la mobilité. Aussi ces colorations sont-elles aujourd'hui délaissées.

C - Immunofluorescence.

Le frottis de sérosité est recouvert d'un sérum contenant des anticorps syphilitiques marqués par un colorant fluorescent. Après lavage, le frottis est

observé à éclairage U.V. pour rechercher les tréponèmes devenus fluorescents. Cette technique est délicate, doit être effectuée par un technicien entraîné. Elle ne permet pas de mettre en évidence la mobilité de la bactérie.

Il est toujours indiqué de compléter la recherche directe de *T. pallidum* par un diagnostic sérologique de la syphilis.

VI - DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DE LA SYPHILIS

Il consiste à rechercher dans le sang des anticorps témoins des manifestations de défense de l'organisme. Cette recherche est l'objet d'un dépistage systématique en médecine préventive notamment lors de l'examen prénuptial et au cours de la grossesse.

De nombreuses réactions ont été utilisées pour mettre en évidence les **réagines**, anticorps dirigés contre le cardiolipide. En 1906, Wassermann appliqua au diagnostic de la syphilis la réaction de fixation du complément décrite par Bordet. C'est la classique réaction de Bordet-Wassermann (B.W.) qui est aujourd'hui abandonnée à cause de son manque de sensibilité. En effet, elle ne détectait pas les syphilis soit anciennes soit très récentes.

Un arrêté paru au Journal Officiel du 12 octobre 1980 impose les techniques à mettre en œuvre. Ce sont les suivantes :

— *Pour un examen systématique de dépistage de la syphilis.*

Une réaction de chacun des deux groupes suivants est faite avec du sérum pur.

- groupe 1 - Kline
 - V.D.R.L.
 - V.D.R.L. - Charbon
- groupe 2 - **T.P.H.A.**
 - F.T.A. - Abs.

— *Pour un examen de contrôle.*

Avant ou au cours du traitement une réaction quantitative de chacun des deux groupes est faite avec des dilutions du sérum du malade. Ces réactions permettent de connaître le taux des anticorps et d'en suivre l'évolution.

À côté de ces réactions usuelles, le test de Nelson ou test d'immobilisation des tréponèmes (T.I.T.) est une technique qui ne doit être utilisée que pour trancher des situations difficiles.

A - Description des réactions

1. Réactions du groupe 1

Ce sont des **réactions d'agglutination** qui détectent les réagines, anticorps antilipidiques. Les réactions de Kline et le V.D.R.L. (Vénérai Disease Research Laboratory) sont basées sur le même principe. Elles consistent à mettre en contact sur une lame le sérum du malade et un antigène composé de cardiolipide, lécithine et cholestérol mis en suspension colloïdale. Après agitation, la présence des réagines entraîne la formation d'agglutinats. L'addition de charbon micronisé pour le V.D.R.L.-Charbon ou de latex pour le V.D.R.L.-latex sont à préconiser car la technique est ainsi plus sensible et la proportion de réactions faussement négatives est diminuée.

Malgré un manque de sensibilité, ces réactions du groupe 1 ont un avantage important : leur simplicité. Quant à la spécificité de ces réactions, elle n'est pas parfaite. Des **réactions faussement positives** ont été décrites au cours de viroses, collagénoses, paludisme, grossesse, dysglobulinémies. Mais elles restent suffisamment rares pour que ces réactions gardent leur valeur.

2. Réactions du groupe II

Elles sont **plus spécifiques** que les réactions du groupe 1 car elles utilisent des antigènes tréponémiques.

al T.P.H.A. (Treponema pallidum haemagglutination assay)

Le réactif est un ultrasonnat de tréponème pâle (souche Nichols) fixé sur des hématies de mouton. Le sérum des malades est dilué dans un absorbant constitué d'un ultrasonnat de globules rouges de mouton et de tréponèmes non pathogènes de Reiter, ce qui a pour but d'éliminer les agglutinines non spécifiques. Le sérum du malade et les hématies de mouton sensibilisées sont mis en présence dans une plaque de microtitration. Une réaction positive se traduit par une hémagglutination en nappe dans la cupule. Une réaction négative, en l'absence d'anticorps, se traduit par une sédimentation des hématies au fond de la cupule.

Du fait de la simplicité de son exécution et de sa spécificité, le T.P.H.A. est une réaction à préconiser en pratique courante.

bl F.T.A.-Abs. (Fluorescent treponemal antibody absorption test).

C'est une réaction d'immunofluorescence indirecte. L'antigène est constitué par du tréponème pâle, souche Nichols. Le sérum du malade est préalablement dilué au 1/5 dans un absorbant constitué d'un extrait de tréponème de Reiter destiné à éliminer les anticorps de groupe non spécifiques. L'antigène et le sérum du malade sont mis en contact sur une lame. Si celui-ci contient des anticorps spécifiques ils se fixent sur les tréponèmes et seront mis en évidence par une antiglobuline humaine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine. Si la réaction est positive, des tréponèmes fluorescents sont vus au microscope équipé d'un éclairage U.V.

Le F.T.A.-Abs. est une réaction extrêmement délicate et difficilement standardisable. Elle doit être réservée à des laboratoires parfaitement entraînés et ne peut être une réaction de pratique courante. Bien codifiée, elle est très spécifique.

3. Le test de Nelson ou test d'immobilisation des tréponèmes (T.P.I.).

Ce test est extrêmement délicat et réservé à des laboratoires spécialisés. En effet, il utilise comme antigène une souche vivante de *T. pallidum*, souche Nichols, entretenue par passages sur testicules de lapin. Les tréponèmes peuvent être maintenus mobiles *in vitro* dans le milieu de survie décrit par Nelson. Les sérums de malades atteints de tréponématose provoquent, en présence de Complément, l'immobilisation des tréponèmes. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'immobilisation dans le tube-réaction comparativement à un tube-témoin dépourvu de Complément. L'interprétation de ce test est la suivante :

0 à 20 %	sérum négatif
20 à 50 %	sérum douteux
50 à 100 %	sérum positif.

Le test de Nelson est une méthode de référence car il est hautement spécifique et il a une bonne sensibilité. A cause de son prix et de sa difficulté de réalisation, il doit être réservé à des situations litigieuses. Toutefois, pas plus que les autres réactions, il ne permet de distinguer entre elles les différentes tréponématoses.

Pour être interprétable, le test de Nelson doit être fait sur du sang recueilli stérilement et ne contenant pas de substances médicamenteuses tréponémicides (antibiotiques).

4. Recherche d'IgM spécifiques

La recherche d'IgM antitreponémiques peut se faire par deux techniques :

a) F.T.A.- Abs. IgM

Cette technique est la plus ancienne. Elle manque de sensibilité et de spécificité. De fausses réactions positives en présence de facteur rhumatoïde ou d'anticorps anti-nucléaires peuvent être observées.

b) SPHA (Solid Phase Hemagglutination Assay) ou test d'immunocapture des IgM

Cette technique est plus simple, plus sensible et plus spécifique que la précédente.

Le principe du test est la capture des IgM par des anticorps monoclonaux anti-IgM humains (chaînes μ) fixés à la surface interne des puits d'une plaque de microtitration. Les sérums à tester sont distribués dans les cupules. Pendant le temps d'incubation, les IgM antitreponémiques éventuellement présentes dans le sérum sont capturées dans les cupules. La présence d'IgM se traduit, après lavage, par l'agglutination d'hématies sensibilisées par un antigène treponémique. En l'absence d'IgM, il y a sédimentation des hématies.

La recherche d'IgM permet de situer l'ancienneté de l'infection, surtout en l'absence de signes cliniques. La présence d'IgM est le meilleur signe d'évolutivité de la maladie. Les IgM sont les premiers anticorps à apparaître et en, l'absence de traitement, peuvent persister jusqu'à la fin de la période secondaire, soit environ 2 ans. Trois situations peuvent être observées :

- IgM positives et TPI négatif : syphilis primaire
- IgM positives et TPI positif : syphilis secondaire
- IgM négatives et TPI positif : syphilis latente pouvant, en l'absence de traitement, évoluer vers une syphilis tertiaire.

B - Évolution du titre des anticorps

Le titre des anticorps est la plus grande dilution du sérum d'un malade donnant une réaction positive.

- *Syphilis primaire*

- Les anticorps détectés par F.T.A.-Abs. apparaissent les premiers, 5 à 8 jours après le chancre, soit environ un mois après le contact (figure 1).

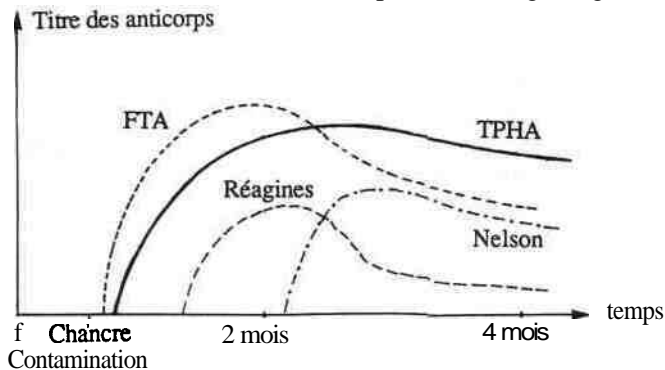


FIGURE 1
ÉVOLUTION DU TITRE DES ANTICORPS DANS UNE SYPHILIS NON TRAITÉE

- Le T.P.H.A. devient positif environ 12 jours après le chancre.
- Les réagines, détectées par le Kline ou le V.D.R.L., apparaissent environ 20 jours après le chancre, soit 5 à 6 semaines après le contage.

Après un traitement précoce, les anticorps se négativent en quelques semaines. Les immobilisines, détectées par le test de Nelson, peuvent ne pas se positiver (figure 2).

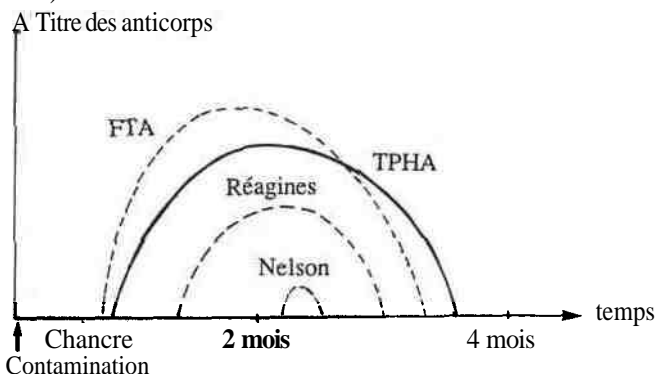


FIGURE 2

ÉVOLUTION DU TITRE DES ANTICORPS DANS UNE SYPHILIS NON TRAITÉE

- ***Syphilis secondaire***
Toutes les réactions sont fortement positives. Les immobilisines apparaissent au début de la période secondaire, environ deux mois après le contage. Ce sont les anticorps les derniers à se négativer sous l'effet du traitement.
- ***Syphilis congénitale***
Les tréponèmes peuvent franchir la barrière placentaire. La naissance d'un enfant d'une mère ayant une sérologie positive impose une étude sérologique du sang du cordon. La différenciation des IgG et des IgM se fait par immunofluorescence.
La présence d'IgM est la preuve d'une syphilis congénitale. Les IgM ne franchissent pas le placenta, elles ont donc été élaborées par le nouveau-né infecté. Les IgG franchissent le placenta. Il peut donc s'agir d'anticorps transmis passivement par la mère. Si l'enfant n'est pas contaminé, ces anticorps qui lui ont été transmis disparaissent en quelques mois.
- ***Anticorps dans le L.C.R.***
Des anticorps peuvent être trouvés dans le L.C.R. lors de la syphilis nerveuse et parfois lors de la période secondaire. Leur titre est toujours inférieur à celui des anticorps sériques.
- ***La sérologie de l'Africain***
La sérologie ne permet pas de distinguer entre elles les différentes tréponématoses. Une sérologie positive est souvent en relation avec une tréponématose non vénérienne autochtone ancienne qui ne présente aucune menace de contamination ou de complication. Dans ces conditions, l'abstention thérapeutique se justifie. Mais une surveillance sérologique et clinique régulière s'impose, car une syphilis récente vénérienne est toujours possible.
- ***Syphilis latente***
Une diminution lente du taux des anticorps survient spontanément. Les anticorps cardiolipidiques peuvent disparaître complètement. Les anticorps tréponémiques spécifiques persistent à un taux bas.
- ***Après traitement***
Les anticorps diminuent d'autant plus rapidement que le traitement est précoce. Les réagines sont les premières influencées par le traitement, d'où l'intérêt de leur titrage pour suivre l'efficacité du traitement.

Si la syphilis évolue depuis plus de 6 mois, il peut être difficile d'obtenir une négativation des réactions tréponémiques. La persistance d'une « cicatrice sérologique » ne protège pas contre une nouvelle contamination qui se traduit par une réascension du titre des anticorps.

VII - TRAITEMENT

A - Traitement curatif

- *T. pallidum* est toujours sensible à la pénicilline G.
La benzathine-pénicilline G ou la procaine-pénicilline G sont les molécules aujourd'hui recommandées. Les modalités d'administration varient en fonction du stade de la syphilis. La pénicilline G est très active sur les tréponèmes se multipliant activement à la phase primaire ou à la phase secondaire. Elle est moins active sur les tréponèmes qui se multiplient peu dans les lésions de syphilis tertiaire.
- Chez les malades allergiques à la pénicilline, les tétracyclines ou l'érythromycine sont utilisées.
- Une réaction d'Herxheimer peut apparaître dans les heures qui suivent le début du traitement antibiotique. Elle se manifeste par un malaise général et une aggravation des symptômes et s'observe surtout au stade secondaire allergique. Elle semble due à une réaction allergique secondaire à la libération de constituants du corps bactérien lors de la lyse des tréponèmes.

B - Prévention

Comme il n'existe pas de vaccin pour l'instant, la prévention est basée sur le dépistage précoce, clinique et sérologique, de la maladie et le traitement des malades afin de stériliser rapidement leurs lésions riches en tréponèmes. Il est difficile de maîtriser la dissémination de la syphilis. Pour cela il faut identifier et examiner les partenaires de tout nouveau cas.

AUTRES TREPONEMES

I - *TREPONEMA PERTENUE*

Treponema pertenue est aujourd'hui considéré comme une sous-espèce de *T. pallidum*. Cette bactérie est responsable du pian, maladie des pays tropicaux, caractérisée par l'apparition sur la peau de tuméfactions (ou pians) à surface granuleuse ayant l'aspect d'une framboise. Des lésions tardives peuvent atteindre les os, mais le pian est moins grave que la syphilis et les complications viscérales sont rares. La transmission est non vénérienne. Elle se fait par contacts divers, souvent dans l'enfance, et est favorisée par une mauvaise hygiène.

II - *TREPONEMA CARATEUM*

T. carateum est responsable du caraté ou pinta observé en Amérique Centrale et du Sud. Il s'agit d'une tréponématose non vénérienne caractérisée par des lésions

cutanées érythémato-squameuses qui atteignent les mains, les pieds et le cuir chevelu. Les complications viscérales sont exceptionnelles.

Les infections à *T. pallidum*, *T. pertenue* et *T. carateum* ne peuvent être distinguées entre elles par les examens sérologiques.

III - TRÉPONÈMES PATHOGÈNES POUR L'ANIMAL

T. hyodysenteriae est responsable de syndromes diarrhéiques chez le porc. **II** peut être cultivé en anaérobiose.

T. paraluisuniculi est responsable d'une infection vénérienne du lapin.

BIBLIOGRAPHIE

DIOP MAR I., MARCHAND J.P., DENIS F., « Pian – bejel », *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, Maladies infectieuses et parasitaires, 1981, 8039 D10,14 p.

PARIS-HAMELIN A., « Aspect nouveau de l'interprétation des sérodiagnostics tréponémiques », *La lettre de l'Infectiologue*, 1987, 2, 229-232.

PILLOT J., « Réflexions sur le contrôle de qualité concernant la sérologie de la syphilis », *Compte-rendu du contrôle de qualité national, Société Française de Microbiologie*, Mars 1981.

Chapitre XXXVII

LES LEPTOSPIRES

Les leptospiroses sont des zoonoses, transmissibles à l'homme, dues à des bactéries du genre *Leptospira*. La maladie avait été décrite par Weil comme un ictère infectieux à rechute. L'agent pathogène a été découvert par Inada au Japon en 1915.

I - CLASSIFICATION

Appartenant à l'ordre des Spirochetales, le genre *Leptospira* constitue à lui seul la famille des *Leptospiraceae*. On distingue deux espèces : *L.interrogans*, pathogène, et *L.biflexa*, saprophyte et aquicole, trouvée dans les eaux stagnantes. Il n'y a pas d'homologie des ADN des deux espèces.

Les leptospires sont divisés en plus de 200 sérovars qui se distinguent uniquement par leurs propriétés antigéniques. En fonction des communautés antigéniques, les sérovars sont regroupés en sérogroupes (23).

Les sérogroupes les plus souvent rencontrés en France sont : *Icterohaemorrhagiae*, puis Grippotyphosa, Canicola, Australis, Pomona, Ballum, Autumnalis et Bataviae.

II - HABITAT ET ÉPIDÉMIOLOGIE

Les leptospires sont très répandues dans la nature. Elles ont une répartition mondiale.

Le réservoir est constitué par les animaux sauvages, surtout les rongeurs, qui sont porteurs sains de leptospires dans les reins et éliminent ces bactéries dans leurs urines.

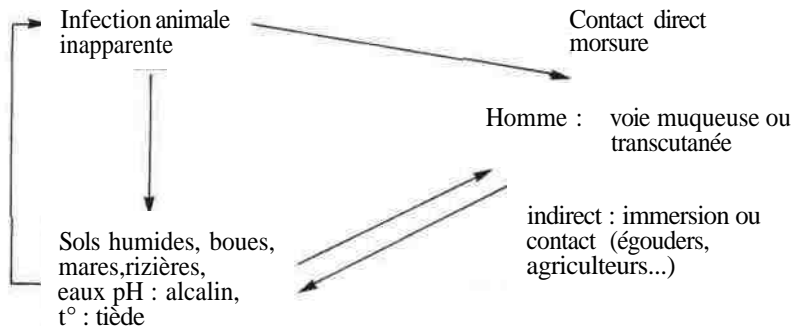
Dans le milieu extérieur, les leptospires peuvent survivre et se multiplier si les conditions sont favorables : eaux stagnantes, pH légèrement alcalin, présence de composés organiques, de boues, de vases. Ces conditions sont réalisées dans les étangs, les marais, les égouts, les rizières, les mines.

La contamination. L'homme peut se contaminer par contact direct avec les animaux (rats, porcs, chevaux, bovins). La leptospirose est une *maladie professionnelle* des égoutiers, éleveurs, ouvriers d'abattoirs, bouchers, mineurs. La contamination indirecte est la plus fréquente (60 % des cas). Elle se fait par pénétration du germe dans une peau ramollie par un séjour prolongé dans l'eau. C'est souvent une maladie des loisirs *au bord de l'eau douce* : pêche, baignade, camping.

Une contamination cutané-muqueuse (conjonctivale ou pharyngée) ou digestive est possible.

En France métropolitaine, il existe un **pic saisonnier** très marqué en juillet et août. Le nombre de cas déclaré est sûrement inférieur à l'incidence réelle de cette maladie. De plus, dans bon nombre de cas, il est probable que le diagnostic de leptospirose n'est pas porté.

La relative fréquence des leptospiroses à l'île de la Réunion est à signaler.



III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie et mobilité

- C'est un micro-organisme flexible, hélicoïdal, mince, à division transversale,
- long de quelques u.m à 40 u.m (le plus souvent 6-20 μm) sur 0,1 μm de largeur,
- les extrémités peuvent être courbées ou en crochet (*biflexa* ou *interrogans*),
- mobilité en rotation alternative, flexion, translation.

1. Examen au microscope optique

Ces bactéries ne sont pas visibles au microscope à fond clair, mais sont visibles au microscope *sa fond noir* ou au microscope à *contraste de phase*, ou par des colorations spéciales :

- imprégnation argentique de Fontana-Tribondeau,
- Giemsa, Vago.

2. Examen en microscopie électronique

On reconnaît différentes structures :

- *Un cylindre protoplasmique* limité par une membrane glucido-peptidique (figure 1),
- *deux filaments axiaux* indépendants, semblables à des flagelles, chacun inséré par une extrémité aux parités subterminales opposées du cylindre protoplasmique. Leur structure est identique à celle des flagelles des bactéries à Gram négatif,
- *une membrane externe* enveloppant tout l'organisme,
- *du matériel nucléaire*, ribosomes et des structures lamellaires ressemblant à des mésosomes sont reconnues.

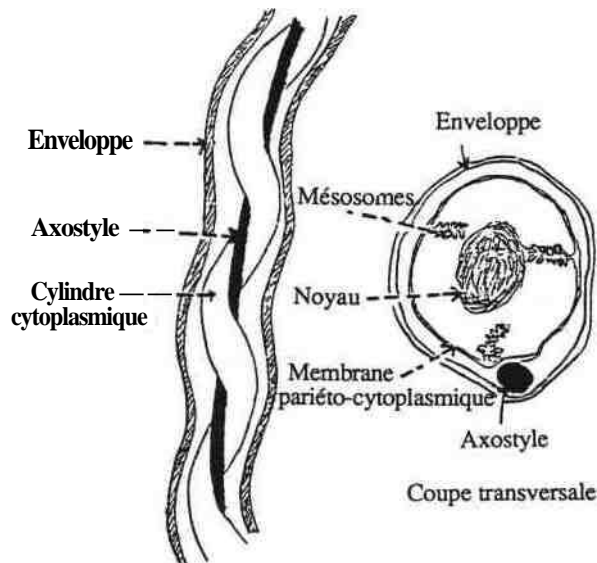


FIGURE 1
ENROULEMENT DU CYLINDRE CYTOPLASMIQUE AUTOUR DE L'AXOSTYLE

B Vitalité

Elle est importante malgré la relative fragilité du germe.

Survie prolongée - dans le sol, les eaux à pH alcalin (7,7),

- au froid,

- en lyophilisant,

- à la température du laboratoire en milieu de Reiter et Rame

avec 20 % de sérum de lapin recouvert d'huile de vaseline.

La survie est de 2 à 3 jours dans les eaux d'égouts, de 18-20 heures en eau de mer.

C - Caractères cultureux

Tous les leptospires peuvent être cultivés en milieu contenant du sérum. En général, ils poussent à 30°C en présence d'oxygène. Ils sont aérobies, mais la culture est favorisée par une atmosphère légèrement enrichie en CO₂.

Les besoins nutritifs : les longues chaînes d'acides gras (24 carbones ou plus) sont nécessaires comme source de carbone et d'énergie. L'ammonium plutôt que les acides aminés apporte l'azote. Des purines, de la thiamine (vit. B₁) et de la cyanocobalamine (vit. B₁₂) sont nécessaires. Les ions Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺ favorisent la croissance.

Une température de 29°C et un pH légèrement alcalin (7,2-7,6) sont les conditions optimales.

D - Substances élaborées

- Pour certains : toxine. Une fraction glucido-lipido-polypeptidique à caractère d'endotoxine a été signalée (Patoc 1),
- certains sérovars produisent une hémolysine tels *panama*, *australis* et *grippotyphosa*,
- enzymes : estérase, oxydase, uréase, transaminase, amidase...

E - Antigènes

Il existerait trois antigènes :

- antigène H, protéique « flagellaire » du filament axial qui a un rôle dans la réaction d'agglutination-lyse,
- antigène O, polysidique, de la paroi « somatique » qui a un rôle dans l'immunité en induisant des anticorps à effet leptospiricide et protecteur,
- antigène de surface de nature inconnue, situé dans l'enveloppe et qui a un rôle dans l'agglutination-lyse.

Les souches, en présence d'immunsérum hétérologue, subissent des variations antigéniques.

L'espèce pathogène *L. interrogans* comprend 20 sérogroupes dont 16 reconnus par l'O.M.S., dont les sérogroupes :

- Icterohaemorrhagia;
- Canicola,
- Autumnalis,
- Hebdomadis, Bataviae, Panama...

Les sérogroupes et sérovars figurent dans le tableau I.

Au sein de l'espèce *L. biflexa*, on reconnaît deux sérogroupes.

TABLEAU 1
LISTE DES SÉROGROUPE ET DES SÉROVARS DE
LEPTOSPIRA INTERROGANS, CLASSÉS ALPHABÉTIQUEMENT EN UTILISANT
LE RAPPORT DE L'O.M.S. DE 1967 COMPLÉTÉ.

Sérogroupe	Sérovar	Souche de référence
Australis	<i>australis</i>	Ballico
Automnalis	<i>bratislava</i>	Jez bratislava
Ballum	<i>autumnalis</i>	AJdyamiA
	<i>ballum</i>	MUS 127
	<i>arborea</i>	Arborea
	<i>castellonis</i>	Castellon 3
Bataviae	<i>batavias</i>	Van Tienen
	<i>djatzi</i>	HS26
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
	<i>schuffneri</i>	Vieermuis 90 C
Celledoni	<i>celledoni</i>	Celledoni
	<i>whittcombi</i>	Whitcomb
Cynopteri	<i>cynopteri</i>	3522 C
Djasiman	<i>djasiman</i>	Djasiman
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
	<i>valbuzzi</i>	Valbuzzi
Hebdomadis	<i>hebdomadis</i>	Hebdomadis
	<i>borincana</i>	HS622
Icterohaemorrhagiae	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
	<i>copenhageni</i>	M 20
Javanica	<i>javanica</i>	Veidrat Bataviae 46
	<i>poi</i>	Poi
Louisiana	<i>louisiana</i>	LSU1945
Mini	<i>mini</i>	Sari
	<i>georgia</i>	LT117
Panama	<i>panama</i>	CZ 214 K
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
	<i>monjakov</i>	Monjakov
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
	<i>biggis</i>	Biggs
Scjroe	<i>scjroe</i>	M 84
	<i>hardjo</i>	Hardjoprajitno
Seramanga	<i>patoc</i>	Patoc I
Shermani	<i>shermani</i>	LT821
Tarassevi	<i>tarassovi</i>	Perepelicin
	<i>bakeri</i>	LT79

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pouvoir pathogène naturel

La leptospirose ictéro-hémorragique ou maladie de Weil et Mathieu n'est pas la forme la plus fréquente. *L'ictère manque dans 80 % des cas de leptospiroses* et l'hépto-néphrite n'existe que dans les formes les plus graves, généralement dues à *L. icterohæmorrhagiæ*.

Le syndrome fébrile débute brusquement 4 à 12 jours après la contamination (voir schéma). Il correspond à un stade septicémique qui dure 5 à 7 jours. Après une amélioration clinique, une rechute fébrile plus courte survient vers le 15^e jour. Une défervescence est observée vers le 20-25^e jour (figure 2).

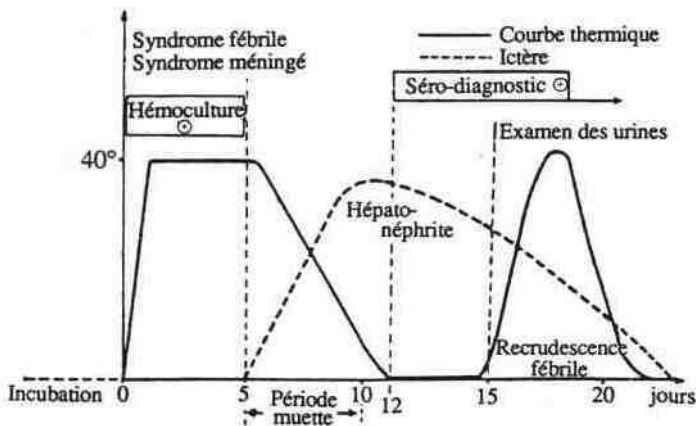


FIGURE 2
SCHÉMA ÉVOLUTIF DE LA LEPTOSPIROSE ICTÉRO-HÉMORRAGIQUE

Les autres signes évocateurs sont : un syndrome algique (myalgies), un syndrome méningé et une injection des conjonctives.

La mortalité en France concerne environ 10 % des cas. Elle est plus élevée Outre-mer.

Les formes cliniques des principaux sérogroupes rencontrés en France sont citées dans le tableau II. Le polymorphisme clinique est important.

TABLEAU II
PRINCIPALES FORMES CLINIQUES DE LEPTOSPIROSES

Sérogroupe	Source de l'infection	Maladie humaine
Icterohaemorrhagiæ	Rat, eau	Maladie de Weil. Hépto-néphrite avec syndrome méningé
Grippotyphosa	Rongeurs, Eau	Fièvre des marais, Méningite aseptique
Canicola	Chien	Jaunisse infectieuse, Syndrome pseudo-grippal, méningite aseptique
Australis Pomona Maladie des porchers	Rat, hérisson	État pseudo-grippal Porc, bétail
Ballum	Souris, mulot	fièvre anictérique méningite aseptique Fièvre des rizières, éruptions

B - Pouvoir pathogène expérimental

Le jeune cobaye est l'animal de choix. Inoculé par voie intra-péritonéale avec du sang ou des urines d'un malade, l'animal devient fébrile en trois ou quatre jours. Puis apparaissent un ictère et des hémorragies. La mort de l'animal survient en moins de deux semaines. L'autopsie (dangereuse pour le manipulateur) permet de retrouver des leptospires en abondance dans le foie, les reins, le sang et l'urine.

V - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE LEPTOSPIROSE

A - Diagnostic direct

L'intérêt des différents examens qui permettent de mettre en évidence les leptospires est présenté dans le tableau ci-dessous.

Dans les formes fulminantes où la mort se produit dans les premiers jours, le diagnostic ne peut être fait que par l'isolement du germe. L'amplification génique *in vitro* pour la détection dans les produits pathologiques est en cours de développement.

Recherche du germe	Date des prélèvements / chronologie de la maladie	Examen direct	Culture	Inoculation à l'animal
sang	7-10 premiers jours	artefacts	++++++	++++
LCR	2-14 jours	++	++++++	++++
Urines	après 12-14 jours	+	++	++++++

1. Recherche par cultures

In vitro : la plupart des souches pathogènes peuvent être isolées sans trop grande difficulté à condition d'utiliser des prélèvements convenables, effectués avant toute antibiothérapie, et d'avoir débarrassé le produit pathologique des autres micro-organismes contaminateurs (dilution, 5-fluorouracil, filtration...).

Des conditions de travail strictes doivent être respectées :

- verrerie sans trace de détergents ou d'antiseptiques et lavée comme pour la virologie (culture de cellules). Le sérum utilisé doit être contrôlé pour son absence d'anticorps antileptospires etc.
- la température d'incubation est de 28-30°C.
- le pH 7,2-7,6.
- le choix d'un milieu de culture ; on peut avoir recours à différents types de milieux :

a) Milieux liquides pour passage et entretien des souches

- Reiter et Ramme additionné de sérum de lapin,
- Vervoot, Korthof,
- Stuan plus récemment commercialisé (asparagine, glycérine, 10 % de sérum de lapin).

b) Milieux géloses

- milieu solide de Noguchi, abandonné,
- milieu de Chang à demi-solide (bactotryptose, extrait de foie, sérum et hémoglobine de cheval),
- milieu de Cox et Larson intéressant,

c) Milieux sans sérum

- milieu de Babudieri,
- milieu de Mailloux, de Shenberg *chimiquement définis*, d'où l'intérêt de ces milieux pour étude métabolique, préparation d'antigènes et de vaccins.

les cultures doivent être contrôlées très rigoureusement par recherche **microscopique** des leptospires au 6^e, 15^e, 21^e, 30^e jour, puis tous les 15 jours pendant deux mois par les techniques suivantes : microscopie à fond noir, technique par fluorescence, coloration argentique.

une fois cultivés, les leptospires doivent être identifiés et surtout classés en espèce :

L. interrogans : pathogènes,

L. biflexa : saprophytes,

grâce à des réactions biochimiques simples.

TEST	pathogène	saprophyte
- action du paraphénylène-diamine	brun-rouge	marron foncé
- action de la 8-azaguanine (225 g/ml)	croissance	croissance
- croissance à basse température 13°C	±	+++
- pouvoir pathogène sur cobaye	+	-

La souche isolée est examinée en agglutination-lyse :

- avec les immunosérums de groupe,
- puis avec les immunosérums de sérovars.

2. Inoculation à l'animal

C'est un temps capital car c'est la méthode directe la plus sensible mais seuls certains sérovars déterminent une maladie mortelle pour le **cobaye** (*L. icterohæmorrhagiæ*, *L. autumnalis*) , dans les autres cas il y a seulement une leptospirémie.

En plus du cobaye, le **hamster** peut être utile notamment pour *L. canicola*.

Les animaux doivent être choisis jeunes et de faible poids.

L'inoculation se fait par voie intra-péritonéale de 0,5 à 1 ml de produit pathologique.

Les animaux sont surveillés cliniquement, pesés, et la température prise 2 fois par jour. L'examen du liquide péritonéal est préconisé.

Post mortem (après décès spontané ou sacrifice au 21^e jour), on pratique sans retard l'examen après autopsie. On cultive les tissus (foie, rein, rate) et on pratique un examen microscopique. Sur le sérum, un examen sérologique peut être pratiqué.

B - Diagnostic sérologique

L'atteinte par les leptospires confère une immunité solide et durable. A partir du **8^e** jour, les anticorps sont généralement décelables, mais leur apparition peut être retardée si le malade a reçu une antibiothérapie précoce.

Le diagnostic indirect comporte deux groupes de techniques.

1. Réactions de dépistage qui sont :

a) La réaction de fixation du Complément

Réaction de groupe quel que soit l'antigène utilisé. Elle nécessite un bon antigène fait de suspension de leptospires merthiolatés et stabilisés.

bl Les réactions macroscopiques

- soit en tubes capillaires (technique de Støenner)
- soit sur lame avec :
- antigènes formulés mélangés (technique de Galton)
- antigènes TR ou antigène thermorésistant (lecture en 4 minutes).

cl La réaction d'hémagglutination :

Faite sur microplaques, c'est une réaction quantitative qui utilise des hématies de mouton sensibilisées par un antigène soluble (HA). L'antigène HA est une extraction alcoolique de *Leptospira biflexa*. La réaction d'hémagglutination est quantitative et est testée par microtitration.

al La réaction microscopique à l'aide de l'antigène biflexa Patoc (leptospire aquicole)

Elle nécessite l'entretien permanent de la souche vivante et un bon microscope à fond noir. Le sérovar de *L. biflexa* donne souvent des réactions croisées avec le sérum de malades atteints de leptospirose.

Toutes ces réactions de dépistage peuvent être positives dès le 8^e jour de la maladie, mais elles se négativent plus précocement que la technique d'agglutination-lyse.

2. Réactions de référence (de confirmation)

C'est la réaction d'agglutination et de lyse (R.A.L.) avec lecture au microscope à fond noir pratiquée avec une grande gamme d'antigènes :

- soit le classique **sérodiagnostic de Martin et Pettit**,
- soit la variante C.D.C. qui nécessite un appareillage microscopique spécial.

La réaction consiste à mettre en présence des cultures de divers sérovats de leptospires (antigènes) et des dilutions de sérum du malade (1/10⁰, 1/10¹, 1/10², 1/10³, 1/10⁴, 1/10⁵) avec un tube témoin culture sans sérum. Après 2 heures d'étuve, une goutte de chaque tube est examinée en fond noir. Si la réaction est positive, la présence d'anticorps se traduit au 1/10⁰ par formation d'amas (agglutination) et au 1/1000^e par des érosions périphériques de ces amas (lyse).

Cette réaction connaît des erreurs :

- par défaut : sérum trop précoce, sérotype inhabituel, traitement précoce par antibiotiques ou corticoïdes,
- **par** excès : du fait de la persistance d'anticorps anciens, du fait de coagglutinations.

3. Autres réactions

Des essais utilisant la technique ELISA ont été conduits afin de s'affranchir des deux facteurs limitant du RAL à savoir l'emploi de souches vivantes et de microscope à fond noir.

La technique ELISA serait moins sensible que la RAL, même si la séroconversion ELISA IgG-RAL est assez parallèle. La méthode ELISA IgM permettrait une détection plus précoce. Le Western-blot a donné des résultats prometteurs avec *L. icterohaemorrhagiae*.

VI - TRAITEMENT

A - Prophylaxie

C'est un problème mondial.

- Les mesures prophylactiques comportent à la fois la lutte contre les rongeurs et les animaux contaminés, la stérilisation des eaux stagnantes, surveillance des plans d'eau, la protection des sujets exposés (par bottes, gants...), des enquêtes sérologiques dans les élevages pour éliminer les porteurs.
- Les leptospiroses sont des maladies professionnelles reconnues comme telles.
- Les préparations vaccinales doivent réunir les sérotyvars propres à la région et être polyvalentes. En France la vaccination humaine n'est recommandée que pour les professionnels exposés. Un vaccin utilisant une souche atténuée est à l'étude.

B - Curatif

Les leptospires sont sensibles à la pénicilline, au chloramphénicol, aux tétracyclines et à la streptomycine. Les macrolides sont également efficaces.

Le traitement doit être prolongé 2 à 3 jours après retour à la normale de la température.

L'efficacité du traitement dépend de sa précocité ; son efficacité est douteuse quand les lésions d'hépatonéphrites sont constituées.

Le traitement se justifie seulement pour les leptospiroses sévères (ictérohémorragiques, d'Extrême Orient, japonaises et à *L. canicola*).

De nombreuses leptospiroses bénignes n'ont pas besoin de traitement. Des traitements adjuvants sont entrepris chaque fois qu'il est nécessaire de lutter contre le déficit hépatique et les signes hémorragiques. Un des problèmes majeurs reste le traitement de l'atteinte rénale qui peut nécessiter une épuration.

BIBLIOGRAPHIE

BARANTON G., POSTIC D., « Méthodes de laboratoire : leptospirose, borréliose de Lyme. » Collection des Manuels techniques. Institut Pasteur, 1989.

BERCHE P., « Leptospires » in *Bactériologie Médicale*, Le Minor, Véron Ed., Flammarion, 1990, pp. 1046-1054..

MARTIN P., PETIT A., « Sérodiagnostic de la spirochètose ictéro-hémorragique », *Bull. Mem. Soc. Med. hop.*, Paris, 1918, **42**, 672-675.

MAILLOUX M., « A propos de l'épidémiologie des leptospiroses », *Rev. Hyg. Med. Soc.*, 1969, **17**, 477-486.

MAILLOUX M., « Les leptospiroses, maladies méconnues et oubliées », *Bull. liaison Ass. An. El. Dipl. Inst. Pasteur*, Paris, 1975, N° 66, 249-254.

QUENIN P., LOUPI G., CLOPPET H., « Technique immuno-enzymatique (ELISA) appliquée au diagnostic des leptospiroses », *Rev. Inst. Pasteur*, Lyon, 1981, 41, 581-584.

Chapitre XXXVIII

BORRELIA

Les *Borrelia* sont responsables des borrélioses, nommées habituellement fièvres récurrentes. Il s'agit de maladies transmises par des **arthropodes** hématophages. En fonction de l'arthropode vecteur, on distingue classiquement deux groupes de borrélioses :

- les borrélioses transmises par les poux,
- les borrélioses transmises par les tiques.

Ce genre bactérien connaît un regain d'intérêt depuis l'isolement de *B. burgdorferi*, agent de la maladie dite de Lyme et des affections apparentées.

HISTORIQUE

A - Fièvres récurrentes

Elles sont connues depuis Hippocrate. C'est au XIX^e siècle que furent individualisées cliniquement les fièvres récurrentes et que l'on isola un agent pathogène : un spirochète sanguicole.

C'est au début du XX^e siècle que furent mis en évidence les agents vecteurs : le pou d'abord, les tiques ensuite. En 1907, les spirochètes responsables de ces fièvres ont été dénommés *Borrelia*, en hommage au bactériologiste français A. Borrel.

B - Maladie de Lyme et affections apparentées

B. burgdorferi est responsable de plusieurs affections :

- *Erythema chronicum migrans* ou érythème de Lipschütz (E.C.M.).
- Maladie dite de Lyme.
- Acrodermatite chronique atrophiante ou maladie de Pick-Herxheimer (A.C.A.).
- Méningo-radiculo-névrite de Garin-Bujadoux-Bannwarth.
- *Lymphadenosis benigna cutis* (L.A.B.C.) : lymphocytome cutané bénin.

Les étapes historiques marquantes sont les suivantes :

1909 : première description d'E.C.M. par Afzelius.

1913 : établissement par Lipschütz des critères d'E.C.M. et du rôle vecteur des tiques du genre *Ixodes*.

1920 à 1945 : premières descriptions des autres affections.

1955 : démonstration expérimentale de l'étiologie infectieuse.

1970 : description du premier cas d'E.C.M. dans l'état du Wisconsin aux U.S.A.

1975 : enquête de Steere parmi les habitants des localités de Lyme souffrant d'arthrites rhumatoïdes se greffant sur un E.C.M.

1978 : mise en évidence du rôle du vecteur *Ixodes dammini* par Steere et coll.

1982 : isolement de l'agent pathogène dans les tiques prélevées à Shelter Island dans l'état de New York par Burgdorfer ; découverte similaire en Suisse chez *Ixodes ricinus*.

1983 : isolement de l'agent pathogène dans des prélèvements humains par Steere et coll.

1 - HABITAT - ÉPIDÉMIOLOGIE

Les *Borrelia* appartiennent à l'ordre des *Spirochaetales* et à la famille des *Spirochaetaceæ*.

Le genre *Borrelia* comprend une vingtaine d'espèces dont les principales caractéristiques épidémiologiques sont mentionnées dans le tableau I.

TABLEAU I
VECTEURS ET MODE DE TRANSMISSION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES DE *BORRELIA*

Borréliose	Espèces de <i>Borrelia</i>	Réservoir	Vecteur	Mode de contamination	Géographie
Fièvre récurrente hispano-nord africaine	<i>B.hispanica</i>	Animaux domestiques rats	<i>Ornithodoros erraticus</i>	Liquide coxal Salive	Espagne, Portugal, Bassin méditerranéen
Fièvres récurrentes du Moyen-Orient et d'Asie	<i>B.persica</i>	rongeurs sauvages	<i>O.tholozani</i>	Salive	Asie Centrale, Inde
	<i>B.latyschewii</i>	rongeurs sauvages	<i>O.tartakowskyi</i>	Salive	Iran, Egypte, Chine
	<i>B.caucasica</i>	rongeurs sauvages	<i>O.verrucosus</i>	Salive	U.R.S.S., Irak, Iran
Fièvres récurrentes américaines	<i>B.turicalae</i>	rongeurs et carnivores sauvages (écureuils)	<i>O.wicasa</i>	Salive	États-Unis (Californie, Floride) Mexique
	<i>B.parkeri</i>	écureuils, chiens de prairies	<i>Oparkert</i>	Salive	Ouest des États-Unis, Canada
	<i>B.hermsii</i>	écureuils	<i>O.hennsi</i>	Salive	Ouest des États-Unis, Canada, (Colombie)
	<i>B.venezueluensis</i>	hommes, singes, marsupiaux	<i>O.venezuelensis</i>	Liquide coxal Salive	Amérique Centrale et du Sud
	<i>B.mazzottii</i>	singes, opossums, tatous	<i>O.taiaje</i>	Salive	Amérique (des U.S.A. à l'Argentine)
Fièvres récurrentes africaines	<i>B.duttonii</i>	homme	<i>Omoubasa</i>	Salive	Afrique Centrale et de l'Est, Madagascar, Arabie
	<i>B.tillae</i>	rongeurs sauvages	<i>O.zumpti</i>	Salive	Afrique du Sud
	<i>B.crocidwae</i>	rongeurs sauvages	<i>O.erraticus</i>	Salive	Afrique Noire, Asie Centrale, Proche-Orient
Fièvre à poux	<i>B.recurrentis</i>	homme	<i>PecUculus humanus</i>	Hémolymphe	cosmopolite
Lymedisease et apparentés	<i>B.burgdorferi</i>	rongeurs	<i>Ixodes da.imn.im</i> <i>I.pacificus</i> <i>I.scapularis</i> <i>I.lcinus</i> <i>I.persulcatus</i>	Liquide coxal	Nord et Est USA Cote Ouest USA Texas, Floride, Europe, Australie, URSS, Japon, Afrique URSS

A - Vecteurs

Leur répartition conditionne l'aire de répartition géographique des borrélioses.

Toutes les espèces de *Borrelia* sont transmises par des arthropodes. Ces vecteurs hématophages sont soit des poux, soit des tiques.

La transmission de *B. burgdorferi* s'effectue essentiellement par des arthropodes : les acariens (famille des *Ixodidae*) et dans une moindre mesure par des insectes (famille des *Culicidae* et des *Tabanidae*).

1. Poux

Ce sont des insectes anoploures. La seule espèce intéressante en pathologie médicale est *Pediculus humanus*.

Tous les stades (larves, nymphes, adultes) sont hématophages. Le pou se contamine en piquant un sujet malade. Le spirochète en cause est *Borrelia recurrentis*.

Dans le pou, *B. recurrentis* ne se trouve que dans l'hémolymphe et il n'envahit ni les glandes salivaires ni l'intestin ; c'est pourquoi la piqûre n'est jamais infestante pour l'homme et la contamination n'est possible que lors de l'écrasement du pou (épouillage, grattage). Les germes peuvent alors traverser activement la peau et les muqueuses.

2. Tiques

Il existe une spécificité entre l'espèce du vecteur et l'espèce de *Borrelia* infestante. Il s'agit :

- soit d'acariens argasidés : les omithodores ou *Ornithodoros*.

L'omithodore s'infecte en piquant un animal infecté et les *Borrelia* ingérés disséminent dans tous ses tissus. L'infection peut alors se transmettre à un organisme sain par piqûre, par le liquide coxal rejeté à la fin du repas sanguin

- soit d'acariens ixodidés : *Ixodes*.

Borrelia burgdorferi est localisé au niveau de l'intestin moyen de la tique. La transmission à l'homme se fait par la tique durant son repas sanguin ; il existe aussi probablement une transmission par la salive et par les régurgitations des sécrétions intestinales.

Ixodes ricinus semble être, en Europe, la principale tique vectrice. En U.R.S.S., *I. persulcatus* a été incriminé comme vecteur de la maladie.

B - Réservoirs

B. burgdorferi est la seule espèce capable d'infecter les mammifères et les oiseaux ; de nombreuses espèces animales sauvages constituent ainsi des réservoirs potentiels de *B. burgdorferi*. En Amérique du Nord, les principaux réservoirs sont des souris (*Peromyscus*) et les cervidés. En Europe, les réservoirs sont les campagnols, les mulots, les cervidés, les renards et les sangliers. Les animaux domestiques peuvent aussi servir de réservoir.

C - Répartition géographique

Elle est résumée globalement à l'échelle mondiale dans le tableau 1 qui indique pour chaque grand type de borréliose le(s) agent(s) pathogène(s), leur(s) vecteur(s), leur(s) réservoir(s), le type de contamination ainsi que les zones infectées.

La figure 1 schématise l'aire de répartition des tiques en Europe. Il existe une spécificité étroite entre le parasite vecteur (*I. ricinus*) et l'agent pathogène de la borréliose de Lyme.

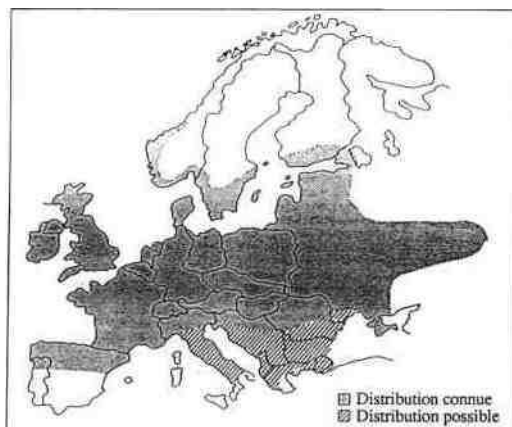


FIGURE 1
AIRE DE RÉPARTITION *D'IXODES RICINUS* EN EUROPE

II - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

A - Les fièvres récurrentes humaines

Schématiquement le tableau clinique typique associe, après une phase d'invasion silencieuse d'une semaine ou plus :

- une fièvre de 39 à 40°C de survenue brutale ;
- un syndrome algique diffus ;
- un syndrome hépato-splénique avec un ictère, des troubles digestifs, une hépatomégalie modérée, une splénomégalie nette ;
- un syndrome neuro-méningé avec des vertiges fréquents, des céphalées très intenses. A la ponction lombaire le liquide céphalo-rachidien est limpide avec une hyperlymphocytose. La centrifugation peut révéler des *Borrelia* dans le culot ;
- un syndrome cutanéomuqueux avec une peau sèche (par différence avec le paludisme), une langue humide recouverte d'un enduit moutarde caractéristique, fréquemment un rash cutané, un épistaxis.

Ce tableau dure quelques jours puis il se produit une défervescence thermique brutale accompagnée d'une crise sudorale et urinaire. Cette phase apyrétique dure une semaine puis la même symptomatologie réapparaît (récurrence). Le nombre de récurrences varie entre 3 et 10 en moyenne selon l'espèce *Borrelia*.

On distingue 5 grands types de fièvres récurrentes qui possèdent des particularités cliniques propres (tableau I).

B - Affections causées par *B. burgdorferi*

On peut distinguer schématiquement trois grands stades évolutifs de la maladie :

1. Stade primaire

Il est caractérisé par une lésion dermatologique typique, *YErythema Chronicum Migrans* (E.C.M.) ou érythème de Lipschütz. Celui-ci survient quelques jours après la morsure de tique, sous la forme d'un érythème papuleux d'extension progressive et centré par la piqûre. Il peut s'accompagner de fièvre, céphalées, asthénie, adénopathies, arthralgies. Parfois le tableau est plus inquiétant (atteintes neurologique, hépatique, articulaire).

2. Stade secondaire

Les manifestations du stade secondaire peuvent survenir quelques semaines voire quelques mois après l'E.C.M. Elles peuvent être soit isolées, soit associées entre elles.

a/ Manifestations cutanées

Les lésions ressemblent à l'E.C.M. initial, mais sont généralement plus petites.

bl Manifestations cardiaques

Il s'agit généralement de troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, mais des myocardites et des péricardites peuvent aussi être observées. Ces manifestations rétrocedent le plus souvent spontanément en quelques jours à quelques semaines.

cl Manifestations articulaires

Elles se caractérisent par de brefs épisodes d'oligo-arthrites asymétriques touchant préférentiellement les grosses articulations (genou).

dl Manifestations neurologiques

Elles peuvent inaugurer le tableau clinique en dehors de la survenue d'un E.C.M., associant de façon variable une méningite lymphocytaire, une névrite crânienne (paralysie faciale essentiellement) et une méningo-radculite souvent asymétrique et très douloureuse.

Ce tableau est proche de celui de la méningo-radculite décrite par Garin, Bujadoux et Bannwarth.

Certains tableaux sont dominés par les manifestations centrales : accident vasculaire cérébral, encéphalite démyélinisante, troubles comateux majeurs.

3. Stade tertiaire

Les manifestations tardives sont caractérisées par leur chronicité.

a/ Manifestations articulaires

Elles se présentent sous la forme d'oligo-arthrites inflammatoires des grosses articulations, évoluant par poussées pendant des années et pouvant entraîner des lésions ostéo-cartilagineuses.

b) Acrodermatite chronique atrophiante (ACA) ou maladie de Pick-Herxheimer

Affection surtout féminine, l'ACA est une dermatose chronique d'évolution progressive, aboutissant spontanément à une atrophie inflammatoire des téguments. Elle peut se compliquer de tumeurs cutanées bénignes à type lymphocytome cutané bénin, de tumeurs malignes (lymphome B).

III - PHYSIOPATHOLOGIE

A. Fièvres récurrentes

Peu d'éléments en sont connus. Le point important est le mécanisme des récurrences : durant son passage dans l'organisme humain, le spirochète présente des variations antigéniques successives responsables de l'absence de production d'anticorps spécifiques, chacune de ces variations antigéniques entraînant une récurrence. Chez *B. hermsii*, ces variations sont codées par des plasmides linéaires.

B. Affections dues à *B. burgdorferi*

B. burgdorferi par contre, ne présente pas de variations antigéniques majeures. Les antigènes ou les facteurs de virulence éventuels, spécifiquement responsables de l'expression du pouvoir pathogène, sont mal connus pour l'instant. Deux plasmides et deux protéines de surface, OspA et OspB de 31 kDa et 34 kDa respectivement, semblent être associés à la virulence. De plus, une activité "endotoxin-like" due à un lipopolysaccharide a été mise en évidence. Des corrélations significatives ont pu être établies avec certains groupes HLA (DR2).

L'étude de l'ADN et des protéines de structure des souches européennes et américaines a révélé l'existence de protéines antigéniques différentes entre ces deux groupes de souches. Cette notion pourrait expliquer l'existence de deux types de tableaux cliniques. On s'oriente actuellement vers la reconnaissance de l'existence de deux sous-espèces de *B. burgdorferi*.

IV - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

A - Affections dues à *B. burgdorferi*

1. Prélèvements

L'agent pathogène peut être recherché dans le liquide céphalo-rachidien, les lésions cutanées, le sang périphérique ; mais il s'agit d'un germe extrêmement fragile.

2. Examen direct

L'étude peut se faire à l'aide d'un microscope à fond noir ou après coloration (Giemsa le plus souvent, ou argentique de réalisation délicate).

On examinera les culots de centrifugation du liquide céphalo-rachidien, les coupes tissulaires.

3. Pouvoir pathogène expérimental

Il n'est pas utilisé à des fins diagnostiques, mais constitue à l'heure actuelle un modèle pour l'étude de la physiopathologie de ces infections. Les animaux les plus utilisés sont le lapin, le cobaye et le hamster.

4. Culture

Pour la culture de *B. burgdorferi* on utilise actuellement le milieu liquide de Barbour-Stoener et Kelly modifié (BSK II, Barbour et coll. 1984) incubé à 33°C. L'inoculation se fait en surface et on recherche une éventuelle croissance en microaérophilie en prélevant toutes les semaines pendant plusieurs mois.

La composition complexe de ce milieu BSK II fait appel à des produits chimiques et microbiologiques, dont la qualité et la marque sont fondamentales pour la réussite des cultures.

5. Morphologie - Structure

Ce sont des spirochètes de 10 à 30 μm de long sur 0,2 à 0,3 μm de diamètre. Us présentent 5 à 7 spires en moyenne, irrégulières et peu serrées, Ils sont mobiles selon des mouvements de rotation et de translation associés.

Sur le plan structural, ils sont entourés d'une enveloppe souple externe. Le cytoplasme est entouré d'une membrane pariéto-cytoplasmique contenant le peptidoglycane.

6. Diagnostic sérologique

La culture est délicate et ses résultats tardifs. Le diagnostic biologique de ces affections est actuellement essentiellement sérologique. *B. burgdorferi* est la seule espèce de *Borrelia* pour laquelle le diagnostic sérologique soit possible. L'interprétation de cette sérologie fait l'objet de nombreuses discussions.

Deux techniques sont utilisées couramment : l'IFI et l'ELISA.

- L'immunofluorescence (IFI), technique la plus utilisée en Europe, est réalisée à l'aide d'un antigène constitué d'une culture de *B. burgdorferi* fixée sur lame selon une technique classique comparable au FTA.
- Les tests ELISA décrits par Russell et coll. et par Magnarelli et coll. en 1984, utilisent un antigène soluble obtenu à partir d'une culture traitée par les ultrasons dans le premier cas et une suspension de spirochètes inactivés dans le deuxième. La révélation des réactions antigène-anticorps se fait avec des sérums anti-immunoglobulines humaines marquées à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase.

Les seuils de positivité varient selon les laboratoires, mais on peut considérer comme significatifs :

- En IFI IgG 1/64^e (1/256 pour certains auteurs)
- IgM 1732^e
- En ELISA IgG 1/200^e.

Des réactions croisées faussement positives existent avec *Treponema pallidum* et rarement avec *Leptospira*. Dans ces affections, le contexte clinique bien différent permet aisément le diagnostic différentiel. Notons d'autre part que chez quelques sujets ayant une sérologie MNI positive on observe 30 % de résultats faussement positifs.

Une meilleure approche du diagnostic sérologique est apporté par l'étude du sérum ou/et du L.C.R. en Western-blot. Cette technique d'immunoblot consiste à révéler, grâce à une réaction immunoperoxydasique, les anticorps dirigés contre les antigènes de *Borrelia* séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide et transférés sur nitrocellulose. Les anticorps IgM et IgG détectés dans le sérum des malades varient selon les stades de la maladie. Il faut évaluer le nombre d'antigènes révélés et leur importance relative pour donner une interprétation. Le Western blot est plus sensible que l'IFI et contribue à améliorer le diagnostic, notamment des formes neurologiques.

D'autres tests sont utilisables (hémagglutination passive et immunocapture pour les IgM).

Il est intéressant d'étudier le taux de positivité et l'évolution des anticorps IgG et IgM selon les différentes affections (Tableau II et Figure 2). En cas d'ECM compliqué, les anticorps restent élevés à distance de la piqûre tandis que pour un ECM

« simple » on observe une négativation au bout d'un certain temps. Peut-on en déduire qu'un taux élevé et persistant doive fait craindre la survenue de complications ?

Le tableau II montre que le taux de positivité du sérodiagnostic est beaucoup plus élevé en cas de complications que lors d'un ECM. La figure 2 montre des IgM élevées dans l'ECM (phase précoce) puis décroissantes dans les atteintes neurologiques et cardiaques (phase tardive). Inversement les IgG sont basses pendant l'ECM et croissent pour être maximales quand l'arthrite s'installe. S'agit-il d'une simple évolution chronologique ou bien est-ce le reflet d'une gravité de la maladie ?

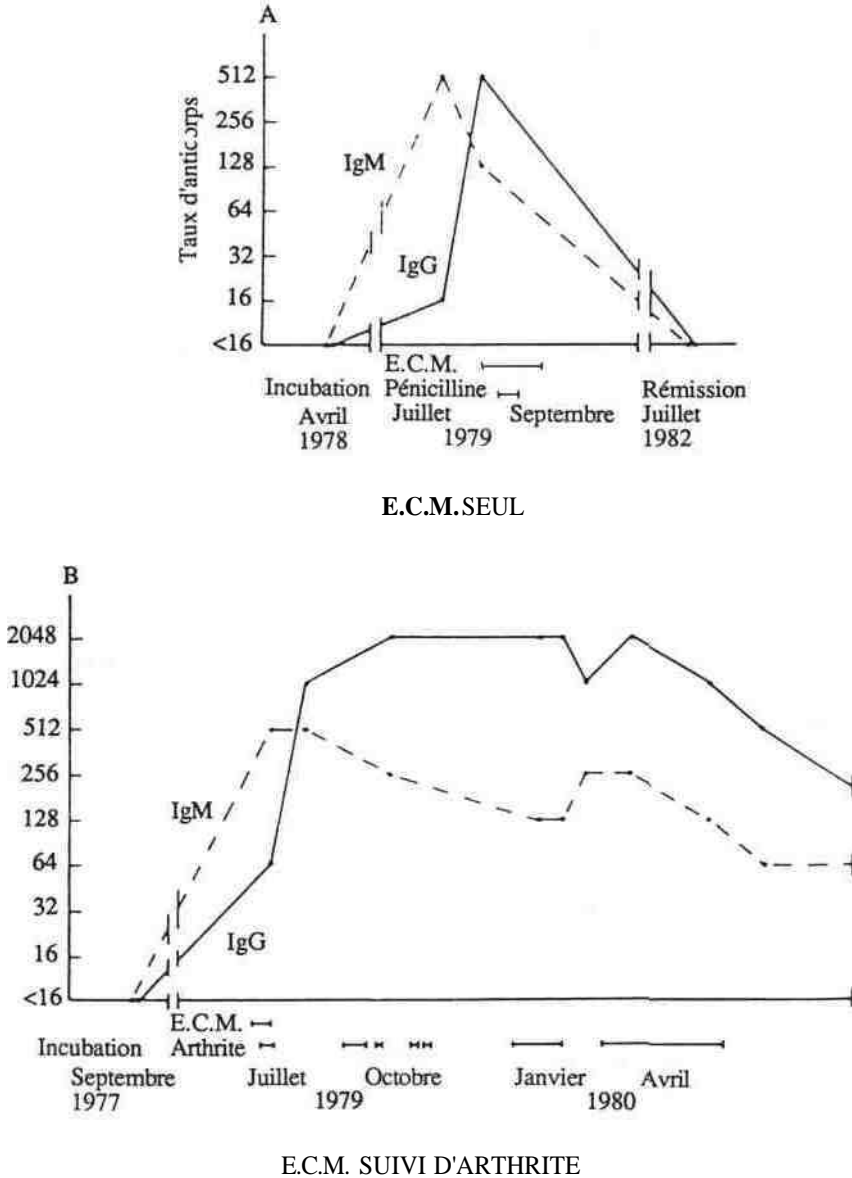


FIGURE 2
CINETIQUES DES ANTICORPS AU COURS DE L'E.C.M.
(d'après Steere et coll., 1983)

TABLEAU n
VALEURS DES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES DANS LES INFECTIONS DUES A
B. BURGDORFERI D'APRÈS RUSSELL ET COLL. (1984)

	% de positivité	
	in	ELISA
ECM	50	50
Myocardite	100	100
Atteintes neurologiques	92	100
Atteintes rhumatismales	100	97
Atteintes multiples	71	80

7. Nouveaux moyens de diagnostic

Les méthodes de détection génotypiques par amplification génique *in vitro* (polymerase chain reaction) semblent être un outil prometteur pouvant se substituer efficacement à la culture pour le diagnostic de ces infections à partir de divers produits biologiques. Des progrès restent à faire pour vulgariser ces méthodes.

B - Fièvres récurrentes

Pour ces borrélioses, le diagnostic est essentiellement microscopique.

Il peut être efficacement étayé par un pouvoir pathogène expérimental. On inocule par voie intra-musculaire ou intra-péritonéale le sang ou le broyât tissulaire infecté. L'animal le plus sensible est la souris Swiss et le rat nouveau-nés. On peut également utiliser le cobaye et le lapin. Si le prélèvement est positif, l'animal fait une maladie proche de celle de l'homme et cela dans un délai inférieur à 15 jours. On réalisera des frottis sanguins tous les 3 jours afin de rechercher après coloration de Giemsa les spirochètes.

Il n'existe pas de sérologie. La confrontation clinique et épidémiologique est prépondérante.

En ce qui concerne la culture, le milieu de Kelly ou le milieu BSK II sont utilisables, mais ne permettent la croissance que de certaines espèces : *B. hermsii*, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. hispanica*, *B. recurrentis*.

V - TRAITEMENT - PROPHYLAXIE

Les *Borrelia* sont des germes très sensibles aux antibiotiques. On utilise de préférence pour les formes non compliquées une bêta-lactamine (ampicilline, amoxicilline, 2 g/j pendant 10 jours) ou un macrolide ou une cycline.

La ceftriaxone (IV, 2 g/j 15 j à 3 semaines) est recommandée et semble la plus efficace pour traiter les formes compliquées, en particulier neurologiques.

Dans les infections à *B. burgdorferi*, il semble qu'un traitement précoce diminue notablement le risque de survenue de manifestations tardives et raccourcit la durée d'évolution des ECM ainsi que la survenue d'atteintes cardiaques et articulaires.

On se méfiera d'un traitement trop énergétique pouvant entraîner une réaction de Jarisch-Herxheimer.

En ce qui concerne la prévention, l'éradication des vecteurs est difficilement réalisable ; les mesures prophylactiques individuelles sont efficaces. Il n'existe pas à l'heure actuelle de vaccin.

BIBLIOGRAPHIE

- BARBOUR A.G., BURGDORFER W., HAYES S.F., PETER O., AESCHLIMANN A., « Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland ». *Curr. Microbiol.*, 1983, **8**, 123-126.
- BARBOUR A.G., HEILAND R.A., HOWE T.W., « Heterogeneity of major surface proteins in Lyme Disease *Borrelia* : A molecular analysis of north american and european isolates », *J. Infect. Dis.*, 1985, **152**, 478-484.
- BARBOUR A.G., RAYES S.P., « Biology of *Borrelia* species », *Microbiol. Rev.*, 1986, **50**, 381-400.
- BARBOUR A.G., « Laboratory aspects of Lyme borreliosis », *Clin. Microbiol. Rev.*, 1988, **1**, 399-414.
- BURGDORFER W., SCHWAN T.G., « *Borrelia* » *m* Manual of Clinical Microbiology, 5th éd., Ballows A. et al. eds, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1991, 560-566.
- CHABAUD M.A., « Fièvres récurrentes », EMC, Paris, *Maladies Infectieuses*, 1973, 5, 8039 P-10.
- JAULHAC B., NICOLINI P., PIEMONT Y., MONTEIL H., « Détection of *Borrelia burgdorferi* in cerebrospinal fluid of patients with Lyme borreliosis », *N. Engl. J. Med.*, 1991, 324, 1440.
- MAGNARELLI L.A., MEEGAN J.M., ANDERSON J.F., CHAPPEL W.A., « Comparison of an indirect fluorescent antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme Disease », *J. Clin. Microbiol.*, 1984, 20, 181-184.
- MONTEIL H., JAULHAC B., PIEMONT Y., « Maladie de Lyme et infections à *Borrelia burgdorferi* en Europe », *Ann. Biol. Clin.*, 1989, 47, 428-437.
- RUSSELL H. SAMPSON J.S., SCHMITH G.P., WILKINSON H.W., PLIKAYTIS B., « Enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for Lyme Disease » *J. Infect. Dis.*, 1984, **149**, 465-470.
- SCHMID O.P., « Thé global distribution of Lyme Disease », *Rev. Infect. Dis.*, 1985, 7, 41-48.
- STEERE A.C., GRODZIDKI R.L., KORNBLATT A.N., CRAFT J.E., BARBOUR A.G., BURGDORFER W., SCHMID G.P., JOHNSON E., MALAWISTA S.E., « Thé spirochetal etiology of Lyme Disease », *N. Engl. J. Med.*, 1983, 308, 733-740.
- SZCZEPANSKI A., BENACH J.L., « Lyme borreliosis : host responses to *Borrelia burgdorferi* », *Microbiol. Rev.*, 1991, 55, 21-34.

SECTION X — BACTERIES PARTICULIERES

Chapitre XXXIX MYCOPLASMA - UREAPLASMA

Les mycoplasmes sont la plus petite forme de vie autonome connue. Ce sont des eubactéries qui appartiennent au groupe des ténéricutes (bactéries sans paroi rigide). Ces bactéries sont limitées par la seule membrane cytoplasmique ce qui leur confère des propriétés particulières et les met à part dans le monde bactérien (Tableau I).

TABLEAU 1
PROPRIÉTÉS DES MYCOPLASMES COMPARÉES A CELLES
D'AUTRES MICROORGANISMES

	MYCOPLASMES	CHLAMYDIA	BACTÉRIES	VIRUS
Présence de paroi rigide	-	+	+	-
Passage à travers les filtres (450 nm)	+	+/-	-	+
Contient ADN et ARN	+	+	+	-
Croissance sur milieux acellulaires	+	-	+	-
Nécessité d'une cellule hôte pour la multiplication	-	+	-	+
Besoin en précurseurs d'acides nucléiques	+	+	-	+
Besoin d'un apport d'énergie	-	+	-	+
Besoins en lipides	+	-	-	-
Croissance inhibée par les anticorps	+	+	-	+
Croissance inhibée par les antibiotiques	+	+	+	-

HISTORIQUE ET CLASSIFICATION (Tableau H)

Pour la première fois en 1898, Nocard et Roux isolent un germe nouveau dans un cas de péripneumonie des bovidés. Puis de nombreux autres microorganismes voisins ont été décrits sous le nom de « Pleuro pneumoniae like organisms » (PPLO).

Nowak propose en 1929 le nom de *Mycoplasma* pour regrouper ces germes sans paroi (myces : champignon — plasma : forme).

Décrit en 1937 par Dienes et Edsall, cultivé par Eaton en 1944 sur œuf embryonné, *Mycoplasma pneumoniae* a été cultivé sur milieu artificiel par Chanock, Hayflick et Barile en 1961 prouvant ainsi le caractère bactérien de cet agent pathogène.

Depuis 1973, les mycoplasmes sont regroupés en une seule classe, celle des Mollicutes (*mollis* : mou - *cutis* : peau), dans l'ordre des Mycoplasmatales, seuls les genres *Mycoplasma*, *Ureaplasma* et *Acholeplasma* peuvent être isolés chez l'homme.

Chez l'animal et les plantes, d'autres espèces pourront également être trouvées : *Spiroplasma*, *Anaeroplasmata*, *Asteroleplasma*.

Les mycoplasmes ont été longtemps confondus avec les formes L des bactéries. Ces formes ont un résidu de paroi qui permet d'assurer leur réplication mais elles sont dépourvues de rigidité et par leurs caractères morphologiques et culturels elles ressemblent aux mycoplasmes. Cependant ces formes L ont gardé les caractères génétiques et biochimiques des bactéries dont elles dérivent et la réversion vers la bactérie normale est parfois possible. Par contre il n'a jamais été montré de relation entre un mycoplasme et une bactérie pourvue de paroi et leur place à part dans le monde bactérien est parfaitement justifiée.

Il faut noter que *Thermoplasma*, autrefois classé avec les mycoplasmes, est une archaebactérie qui possède un habitat particulier : tas de résidus de la combustion du charbon, siège d'une autocombustion, avec des conditions de cultures extrêmes (pH 1 à 4 et 37 à 65°C) en présence de sulfure de fer.

TABLEAU n
CLASSIFICATION ET PRINCIPALES PROPRIÉTÉS DES MOLLICUTES

CLASSE	MOLLICUTES					
ORDRE	MYCOPLASMATALES			ANAEROPLASMATALES		
FAMILLE	<i>Mycoplasmataceae</i>		<i>Acholeplasmataceae</i>	<i>Spiroplasmataceae</i>	<i>Anaeroplasmataceae</i>	
GENRE	<i>Mycoplasma</i>	<i>Ureaplasma</i>	<i>Acholeplasma</i>	<i>Spiroplasma</i>	<i>Anaeroplasmata</i>	<i>Asteroleplasmata</i>
Nombre d'espèces connues	80	3	8	9	4	1
taille génoise $\times 10^8$ Da	5	5	10	10	10	ND
G+C	23-41	28	29-35	26	29-34	ND
Besoin en cholestérol	+	+	-	+	±	-
Localisation NADH-oxydase	cytoplasme	ND	membrane	cytoplasme	ND	ND
Propriétés caractéristiques		activité uréasique		forme hélicoïdale	anaérobie strict	anaérobie strict
Habitat	animaux homme	animaux homme	animaux (homme)	insectes et plantes	tube digestif ruminants	tube digestif ruminants

1 - HABITAT

Chez l'homme, les mycoplasmes et uréaplasmes peuvent être isolés des tractus génitaux et respiratoire.

M. ovale et *M. salivarium* sont des commensaux de la cavité bucco-pharyngée. Par contre, *M. pneumoniae* ne fait pas partie de la flore normale et sa présence dans les voies aériennes est toujours pathologique.

M. hominis et *U. urealyticum* sont des hôtes normaux des voies génitales masculine et féminine et leur fréquence d'isolement est directement liée à l'activité sexuelle.

II - PHYSIOPATHOLOGIE

Les mycoplasmes sont rarement présents à l'état libre dans l'organisme et ils s'attachent aux cellules de l'hôte, résistant ainsi aux flux des fluides biologiques dans la lumière des organes colonisés.

L'attachement se fait sur des récepteurs qui seraient, au moins en partie, de l'acide sialique pour *M. pneumoniae*.

Seules les souches adhérentes sont virulentes. Elles provoquent par exemple au niveau des cellules de la trachée, une ciliostase, puis une desquamation de l'épithélium (*M. pneumoniae*).

Parmi les facteurs favorisant la virulence, on retrouve :

- des produits terminaux du métabolisme cellulaire : l'eau oxygénée qui agit directement sur les membranes : l'ammoniaque produite en grande quantité par l'hydrolyse de l'urée (*Ureaplasma*) ou de l'arginine (*M. hominis*), provoquent des altérations cellulaires. De même le galactose produit par *M. mycoides* entraîne des hémorragies chez l'animal ;
- des toxines : *M. neurolyticum* produit une neurotoxine ; l'injection de *M. fermentans* ou de sa membrane en grande quantité à la souris produit un tableau comparable à une endotoxémie due aux bacilles à Gram négatif ;
- des enzymes : le mycoplasme, détourne à son profit le cholestérol et d'autres nutriments de la membrane de la cellule-hôte, créant ainsi une déplétion létale.

III - POUVOIR PATHOGÈNE DES MYCOPLASMATACEAE CHEZ L'HOMME

A - *Mycoplasma pneumoniae*

1. Localisations pulmonaires

M. pneumoniae (ou agent d'Eaton) est responsable classiquement de la **pneumonie atypique** à agglutinines froides. *M. pneumoniae* transmis par voie aérienne sévit par petites épidémies pendant la saison froide et s'observe classiquement surtout chez l'enfant de plus de cinq ans, l'adolescent ou l'adulte jeune ; mais il peut provoquer des pneumopathies graves chez les sujets âgés ou immuno-déprimés. Ces atteintes n'ont rien de spécifique et en fait *M. pneumoniae* serait responsable de 10 % des pneumonies atypiques, confirmées radiologiquement.

Après une incubation relativement longue (moyenne 12-14 jours allant jusqu'à 35 jours), l'invasion est progressive et se traduit par un état fébrile avec frissons, céphalées, arthralgies... alors que le germe reste localisé à la trachée et respecte relativement l'intégrité du parenchyme. Cela provoque une toux tenace et sèche associée à un tableau clinique assez pauvre. La radiographie montre d'importantes anomalies souvent unilobaires (opacités non homogènes, épaississement des hiles...). Des surinfections virales, ou bactériennes sont possibles. La guérison est lente caractérisée par une asthénie persistante, alors que les signes pulmonaires ont disparu.

2. Complications

- manifestations cutanées éruptives (exanthèmes, syndrome de Stevens-Johnson...) rares,
- manifestations ORL, sanguines (anémie hémolytique), articulaires, pancréatiques, cardiaques (péricardites).

- manifestations neuro-méningées (syndrome de Guillain-Barré, méningites aseptiques...)
- les septicémies sont rares.

La plus grande prudence s'impose dans toutes les atteintes extra-pulmonaires dans lesquelles le diagnostic étiologique ne repose que sur la sérologie. En effet la bactérie n'est qu'exceptionnellement isolée en dehors de l'arbre respiratoire.

Les manifestations cliniques des infections à *M. pneumoniae* pourraient être dues à un phénomène immunologique par sensibilisation de l'individu. En particulier une parenté antigénique entre les glycolipides de la membrane cytoplasmique de la bactérie et ceux du tissu cérébral expliquerait la survenue de complications neurologiques en l'absence d'isolement du mycoplasme dans le LCR.

B - Mycoplasmes génitaux

Etant donné que ce sont des commensaux des voies génitales, il est difficile de leur attribuer un rôle pathogène. Les autres étiologies (en particulier *Chlamydia trachomatis*) doivent être éliminées avant de rattacher un épisode infectieux à une infection à mycoplasme.

Cependant les mycoplasmes génitaux ont été impliqués dans de multiples atteintes.

i. Chez l'homme

- urétrites non gonococciques (la présence de $\geq 10^4$ UFC/ml dans le prélèvement serait considérée comme significative),
- prostatites, épидидymites.

2. Chez la femme

U. urealyticum et *M. hominis* sont isolés respectivement chez 60 % et 20 % des femmes en période d'activité génitale. Malgré le caractère commensal de ces bactéries, elles ont été mises en cause dans :

- des vaginites non spécifiques,
- des salpingites (et seraient alors cause de stérilité),
- les lièvres du post-partum (avec endométrites), au cours desquelles il est possible d'isoler ces deux germes dans les hémocultures. Dans la majorité des cas, cette bactériémie est transitoire et ces atteintes sont bénignes.

Chez la femme enceinte, la présence de mycoplasmes a été associée à des avortements prématurés, des hypotrophies, mais sans que les preuves indubitables de leur responsabilité aient été apportées.

Chez le nouveau-né, prématuré ou porteur de malformations, des infections nerveuses (avec présence de mycoplasmes dans le LCR ou les tissus cérébraux) et pulmonaires ont été rapportées.

U. urealyticum, en raison de son activité uréasique, a été rendu responsable de lithiases.

En fait il est très difficile d'affirmer le rôle pathogène des mycoplasmes génitaux même en cas d'isolement au cours d'un épisode infectieux. En effet, il peut toujours y avoir une contamination du prélèvement et ces bactéries étant fréquentes dans les voies génitales, elles pourraient surinfecter (ou coinfecter) une lésion due à un autre agent pathogène.

IV - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Les mycoplasmes sont pléiomorphes (formes rondes, ovoïdes, filamenteuses ou en chapelet, sensibles aux agents physiques (force osmotique, pH, agents tensio-actifs, température) mais résistent bien à la congélation.

Ils sont faiblement colorés par le Giemsa et peuvent être observés en contraste de phase ou au microscope électronique.

B - Structure

Le génome est de petite taille (ça. 5×10^8). La membrane cytoplasmique contient du cholestérol (sauf *Acholeplasma*) qui n'est pas métabolisé mais qui permet à la bactérie de réguler la fluidité de la membrane, des glycolipides (*M. pneumoniae* et *M. genitalium*) et des glycoprotéines qui jouent un rôle dans l'adhésion aux cellules eucaryotes.

C - Croissance

Les mycoplasmes se multiplient par division binaire sans qu'il y ait synchronisation entre la réplication du génome et la séparation des cellules : il se forme des filaments qui se divisent par étranglement en forme coccoïde.

Le temps de génération varie d'une heure (mycoplasmes génitaux) à 6 heures (*M. pneumoniae*) et plus encore pour *M. genitalium*.

Sur milieu solide les colonies apparaissent en 48 heures (mycoplasmes génitaux), 5 jours (*M. pneumoniae*) ou 3 semaines (*M. genitalium*). La plupart des mycoplasmes forment des colonies en oeuf sur le plat (le centre de la colonie pénètre dans la gélose) mais *M. pneumoniae* forme des colonies mûriformes. Ces colonies ont un diamètre de 100 à 400 μm ; *U. urealyticum* forme de petites colonies en "oursin" de 20 à 80 μm de diamètre.

D - Métabolisme

Les mycoplasmes sont en général anaérobies facultatifs. Ils tirent leur énergie de la fermentation du glucose (*M. pneumoniae*, *M. fermentans*) ou de la dégradation de l'arginine en ornithine (*M. hominis* et *M. fermentans*) ou de l'hydrolyse de l'urée (*U. urealyticum*).

Ils cultivent en atmosphère micro-aérophile sauf *M. pneumoniae* et *M. genitalium* qui nécessitent une aérobose. Dans tous les cas le CO_2 favorise la croissance.

Les mycoplasmes exigent des milieux riches avec de l'extrait de levure et du sérum. Ce dernier apporte le cholestérol nécessaire à la croissance.

Il existe très peu de caractères biochimiques permettant de différencier les souches de mycoplasmes : *M. pneumoniae* réduit le triphényl tétrazolium (TTZ) et produit une hémolyse qui agit sur les hématies de cobaye. Les mycoplasmes sont résistants naturellement aux antibiotiques qui inhibent la synthèse du peptidoglycane (B-lactamines, cyclosérine...).

E - Structure antigénique

D'après la structure antigénique, on a distingué au sein des mycoplasmes quatre groupes :

- *M. pneumoniae* et *M. genitalium*,
- *M. hominis*, *M. salivarium*, *M. orale*,
- *M. fermentans*
- *U. urealyticum*.

La connaissance de la structure antigénique des mycoplasmes a un triple intérêt :

- pour l'identification par inhibition de croissance et par inhibition métabolique,
- dans la perspective d'un diagnostic direct par recherche d'antigène directement dans les produits pathologiques (*M. pneumoniae*),
- pour les sérodiagnostics.

De multiples sérotypes d'*U. urealyticum* et de *M. hominis* ont été décrits. Chez *M. hominis* un antigène commun de 102 kDa a été décrit. Un seul sérotype de *M. pneumoniae* est connu. Cette bactérie possède des glycolipides dans sa membrane cytoplasmique qui sont des haptènes quand ils sont purifiés. Les anticorps dirigés contre ces glycolipides réagissent avec des structures analogues trouvées chez les plantes et dans le tissu cérébral humain.

TABLEAUffI
CARACTERES PRINCIPAUX DES ESPECES
DE MYCOPLASMES ISOLEES CHEZ L'HOMME
(d'après C. Bébéar et coll.)

ESPECES BIOCHIMIQUES - ;nbre de sérotypes)	SITES D'ISOLEMENT			Pouvoir pathogène	PROPRIETES		
	respiratoire	urogénital	autre		glucose	arginine	urée
<i>M. pneumoniae</i> (1)	+	-	(+) ^a	+	+b		
<i>M. salivarium</i>	+			-		+	
<i>M. orale</i>	+	-	-	-		+	
<i>M. buccale</i>	(+)			-		+	
<i>M. faucium</i>	(+)			-		+	
<i>M. lipophilum</i>	(+)			-		+	
<i>M. primatum</i>	(+)			-		+	
<i>M. hominis</i> (7)	(+)	+	(+)	+		+	
<i>M. genitalium</i>	(+)	(+)		(+)	+b	+	
<i>M. fermentans</i>		(+)		-	+	+	-
<i>A. laialawii</i>	(+)			-	+	-	-
<i>U. urealyticum</i> (16)	(+)	+	(+)	+			+

^ararement isolé, ^b*M. pneumoniae* et *M. genitalium* ont des propriétés d'hémadsorption

V - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

A - Diagnostic direct

1. Prélèvements

Du fait des propriétés d'adhésion de ces bactéries, il faut recueillir le maximum de **cellules épithéliales**. Les prélèvements seront effectués à la phase aiguë de la maladie, si possible avant toute antibiothérapie,

- infections pulmonaires : expectorations du matin ou mieux brossages endobronchiques ou lavages alvéolaires,

- infections génitales : grattage urétral, prélèvement vaginal,
- autres prélèvements : les tissus ne seront pas broyés mais dilacérés au scalpel avant ensemencement. Le liquide céphalorachidien et le sang seront déposés dans un milieu liquide. La recherche de mycoplasmes génitaux peut être faite à partir d'un culot urinaire.

2. Transport et stockage

L'idéal est de procéder à un ensemencement immédiat. A défaut on utilise un milieu de transport contenant de la pénicilline et de l'albumine bovine. Un stockage à 4°C permet de différer l'ensemencement d'une semaine.

3. Recherche directe

La recherche des germes par immunofluorescence avec des anticorps monoclonaux est à l'étude et le développement de sondes oligonucléotidiques est en cours.

4. Cultures

Etant donné les différences entre les caractères cultureux, la recherche de *M. pneumoniae* et de mycoplasmes génitaux n'est pas faite dans les mêmes conditions (tableau IV).

TABLEAU IV
CARACTERES CULTURAUX ET ANTIGENIQUES DES
MYCOPLASMES PATHOGENES POUR L'HOMME

	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma, urealyticum</i>
CULTURE				
pH	6,5-7,5	7,3-8	5,5-8	5,5 - 6,5
conditions	aérobie	aérobie	microaérophilie	microaérophilie
durée	6-20J	21 j	2J	2J
COLONIES				
diamètre	mûrifformes 100 - 400 µm	oeuf sur le plat 100 - 400 µm	oeuf sur le plat 100 - 400 µm	"oursin" 10 - 80 µm
SEROTYPES	1	?	7	14

Si les caractères cultureux des mycoplasmes génitaux permettent un diagnostic d'espèce avec une bonne approximation, par contre pour affirmer les diagnostic de *M. pneumoniae*, il faudra rechercher des caractères complémentaires (hémolyse des globules rouges de cobaye, réduction du TTZ...).

Un diagnostic d'espèce pourra être porté avec précision en utilisant l'inhibition de croissance par un immunsérum homologue.

En pratique, la recherche de mycoplasmes génitaux est très aisée avec des techniques simples et il est actuellement inutile de développer d'autres moyens de diagnostic.

Par contre la recherche de *M. pneumoniae* est plus aléatoire et de faible sensibilité. Dans ce cas, il peut être intéressant de disposer de moyens diagnostics fiables et rapides pour la recherche de cet agent pathogène dont la fréquence est loin d'être négligeable. Actuellement on s'oriente plus vers des recherches directes dans les prélèvements par immunofluorescence directe mais surtout par sonde de DNA

(hybridant avec le RNA ribosomal de *M. pneumoniae*) et plus récemment la recherche de DNA dans les prélèvements par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

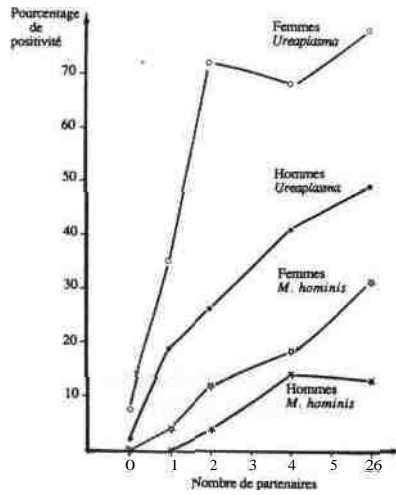


SCHÉMA 1
FRÉQUENCE D'ISOLEMENT D'*UREAPLASMA UREALYTICUM* ET DE *MYCOPLASMA HOMINIS* EN FONCTION DU NOMBRE DE PARTENAIRES

Prélèvements	urines, spermes, écouvillonnages vaginaux ou urétraux	gorge, crachats, selles, ponctions vésicules, LCR, sang, fragments de tissus
1 ^e passage sur milieu Condition de culture	bouillons spécifiques d'isolement pH 6 : 35 à 37°C 16 à 20h puis agités à 4°C	bouillon glucose gélose glucosée pH 7,4-7,8 : 36°C 4 à 6 j. avant 2 ^e passage 8 j. à 3 scm. atmosphère de CO ₂ à 5-10 % dans N ₇
2 ^e passage sur milieu d'identification	bouillon à l'urée 48 h à 4 j. gélose à l'urée 3 à 4 j. atmosphère en CO ₂ dans N ₂	bouillon à l'arginine bouillon glucose 8 à 15 j. 2 géloses glucosées dans l'air / en CO ₂ dans N ₂
Observer si l'isolement de mycoplasmes est positif	Virage du jaune au rouge pour <i>Ureaplasma</i> Colonies brun-noir pour <i>Ureaplasma</i> Colonies incolores en « œuf sur le plat » (genre <i>Mycoplasma</i>)	virage du jaune orangé au rouge si arginine hydrolysée Virage du rouge au jaune si glucose fermenté Colonies en « œuf sur le plat » (parfois pas d'auréoles)
3 ^e passage éventuel	Bouillon du 1 ^e passage passé sur un autre bouillon d'isolement pour sérotypage ou antibiogramme éventuel.	Bouillon du 2 ^e passage ou cubes de gélose repassés pour antibiogramme et typage éventuel.

SCHÉMA 2
SCHÉMA D'ISOLEMENT DE SOUCHES DE MYCOPLASMES HUMAINS
(Fiche technique de Diagnostics Pasteur)

B - Diagnostic indirect :

1. Mycoplasma pneumoniae

L'isolement de *M. pneumoniae* étant long et donnant des résultats inconstants, le diagnostic d'infection est souvent porté sur le résultat de la sérologie. Dans les manifestations extrapulmonaires des infections à *M. pneumoniae*, la sérologie est souvent le seul argument pour affirmer l'étiologie de l'atteinte observée.

a/Réaction de fixation du Complément

C'est la technique courante, elle utilise l'antigène glycolipidique. Cette réaction peut être effectuée sur microplaques et automatisée.

La persistance des anticorps après une infection est mal connue, aussi un taux élevé unique doit être interprété avec prudence. Par contre, une séroconversion entre deux prélèvements effectués à 2-3 semaines d'intervalle est en faveur d'une infection à *M. pneumoniae*.

bl Les autres techniques

Les recherches d'anticorps par d'autres techniques est possible, mais de peu d'intérêt en pratique.

L'inhibition métabolique (inhibition de la réduction du TTZ) est délicate à mettre en oeuvre et donne des résultats tardifs.

D'autres techniques ont été proposées (immunofluorescence indirecte, hémagglutination, techniques ELISA).

Actuellement on s'oriente vers une sérologie plus spécifique qui met en oeuvre la protéine d'adhésion PI, qui joue un rôle dans la physiopathologie de l'infection. La recherche d'anticorps contre cette protéine peut être faite par inhibition de l'adhésion de *M. pneumoniae* aux hématies de mouton ou par une technique de "dot-ELISA". n peut y avoir des réactions croisées avec *M. genitalium*.

cl La recherche d'agglutinines froides

Elle est abandonnée car elle n'est pas spécifique : ces agglutinines ne sont présentes que dans la moitié des infections à *M. pneumoniae* et elles sont également présentes au cours d'infections virales.

2. Les mycoplasmes génitaux

Des techniques sérologiques ont été proposées pour la recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre *M. hominis* et *U. urealyticum* : l'inhibition métabolique ou ELISA.

La présence de multiples sérotypes complique cette recherche. Celle-ci est de peu d'intérêt dans les infections bénignes (urétrites) et elles ne pourraient servir que pour un diagnostic étiologique d'infections génitales hautes (salpingites, épидidymites). Mais étant donné la grande fréquence d'isolement de ces bactéries, une sérologie doit être interprétée avec prudence car le niveau d'immunisation de la population n'est pas connu.

VI - TRAITEMENT

A - Préventif

Les essais de vaccin contre *M. pneumoniae* en utilisant diverses fractions ont été étudiés et fournissent une protection partielle (germes atténués, formolés...). Actuellement un espoir est apporté par l'utilisation de la protéine PI purifiée.

B - Curatif

M. pneumoniae est régulièrement sensible aux cyclines et aux macrolides. Par contre, *M. hominis* est résistant à l'érythromycine et *U. urealyticum* aux linco-samides. Par contre, ces deux espèces sont sensibles aux cyclines. Les fluoro-quinolones sont peu actives. L'apparition de souches résistantes peut rendre intéressante la pratique d'un antibiogramme en milieu liquide (en recherchant une inhibition métabolique).

CONCLUSION

Les mycoplasmes n'ont pas une place importante en pathologie humaine. Par contre, chez l'animal, les mycoplasmes ont un pouvoir pathogène important qui se traduit en particulier par une morbidité élevée dans les élevages.

La présence de mycoplasmes dans les milieux de cultures cellulaires est responsable d'effets cytopathogènes et parfois de la mort des cellules. Cette contamination, d'origine animale (lors de l'isolement des cellules) ou humaine (fautes d'asepsie) est difficile à éliminer.

L'importance économique et l'originalité de la structure des mycoplasmes font que ces bactéries sont actuellement très étudiées.

Elles sont de mieux en mieux connues et il est vraisemblable que leur taxonomie va évoluer dans les années à venir.

BIBLIOGRAPHIE

BEBEAR C., DE BARBEYRAC B., BERNET C., RENAUDIN H., «Méthodes d'exploration des infections à mycoplasmes». *Ann. Biol. Clin.*, 1989, 47, 415-420.

CLYDE W.A., CHANOCK A.M., TULLY J.G., *Mycoplasma* in : DAVIS B.D., DULBECCO R., EISEN H.N., GINSBERG H.S. (Eds) 4th éd. 1990 pp. 707-716, J.B. LIPPINCOTT Co., Philadelphia.

LE FAOU A., «Mycoplasmes et Grossesse». *Le Concours Médical*, 1985, **107**, 3791-3794.

QUENTIN C., CANTET P., RENAUDIN H., BEBEAR C., « Sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes pathogènes pour l'homme ». *Path. Biol.*, 1985, **33**, 205-212.

Chapitre XL

RICKETTSIA

HISTORIQUE

En 1916 Rocha-Lima découvre dans le corps d'un pou parasitant un malade atteint de typhus, maladie connue depuis longtemps, de fins microorganismes auxquels il donne le nom de *Rickettsia prowazekii*, du nom de deux bactériologistes morts de typhus en étudiant cette maladie : Von Prowazek et Ricketts.

Lors d'investigations similaires, d'autres microorganismes à morphologie voisine ont été trouvés, mais c'est essentiellement le contexte clinique et épidémiologique qui permet à cette époque de les différencier entre elles. C'est ainsi que l'on a individualisé successivement :

- 1899 - *Fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses* dont Ricketts montre en 1906-1909 la transmission par la tique *Dermacentor andersoni*
- 1909 - *Ch. Nicolle* à l'Institut Pasteur de Tunis décrit la transmission du typhus épidémique par le pou
- 1910- *Brill* isole le typhus réurgent dont la description sera reprise par Zinsser 20 ans après, d'où le nom de la maladie de *Brill-Zinsser*
- 1915 - *Schüffner* identifie le typhus tropical ou Scrub-typhus
- 1928 - *Mooser* sépare le typhus murin du typhus épidémique
- 1937- *Derrick* isole à Brisbane (Queensland) l'agent de la fièvre Q, alors baptisée Query Fever, et en 1939 propose le nom de *Rickettsia burnetii* en l'honneur de Burnet qui, en collaboration avec Freeman, avait montré la distinction de cette infection avec les autres typhus.

1 - CLASSIFICATION

Les *Rickettsia* sont des **bactéries intracellulaires obligatoires**. Elles sont presque aussi petites que les plus gros virus. Cependant il s'agit bien de bactéries puisque ces germes se divisent par scissiparité, qu'ils possèdent à la fois de l'ADN et de l'ARN et qu'ils sont sensibles aux antibiotiques.

Dans la famille des *Rickettsiaceae* quatre genres sont responsables d'une pathologie chez l'homme.

- *Rickettsia*, avec plusieurs espèces responsables du typhus et des fièvres exanthématiques :
R. prowazekii, *R. typhi*, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. australis*, ***R. akari***, *R. tsutsugamushi* (*R. orientalis*), *R. sibirica*
- *Coxiella*, avec une seule espèce, *Coxiella burnetii*, responsable de la fièvre Q
- *Ehrlichia* avec plusieurs espèces responsables d'infections du chien (*E. canis*), du cheval (*E. risticii* et *E. equi*) et du bétail (*JE. phagocytophila*). L'ehrlichiose humaine est une maladie peu fréquente décrite sur la côte sud du Japon et dans le sud-est asiatique (*E. sennetsu*) et, depuis 1986, aux USA (agent non encore identifié). Elle se traduit par un syndrome pseudogrippal, de la fièvre, des adénopathies généralisées et

parfois par une hépatosplénomégalie et un exanthème. Elle se confond aisément avec une mononucléose infectieuse, mais le malade présente souvent des antécédents de morsure de tique, des troubles des tests hépatiques, une diminution du nombre d'éléments figurés du sang et une réaction sérologique positive avec un antigène formé par *E. canis*. Ce germe est transmis à l'homme par des tiques. Les réservoirs de germes sont encore inconnus.

- *Rochalimaea quintana* est responsable d'accès fébriles ayant une durée de 24-48H et séparés par des périodes apyrétiques, c'est la fièvre des tranchées (ou de Voïhynie). On observe une leucocytose et une splénomégalie. La guérison survient en 5 à 6 semaines. Ce germe est transmis à l'homme par les déjections du pou de corps. Sa capacité à se multiplier *in vitro* en milieu acellulaire a justifié la création du genre nouveau.

Les études génétiques en cours, analysant les profils de restriction grâce à l'électrophorèse en champ puisé par exemple, devraient permettre dans un proche avenir de mieux connaître les relations inter- et intra-spécifiques de ces espèces.

II - HABITAT

La recherche de *Rickettsia* chez de nombreux arthropodes montre qu'elles sont très répandues ; l'infection se produit généralement par ingestion. Certaines espèces restent localisées dans la cavité digestive, d'autres envahissent le corps de l'animal ; les glandes salivaires peuvent alors contenir le germe, ce qui explique la transmission par piquûre.

On les retrouve aussi chez différents réservoirs (homme, rat, chien, rongeur sauvage) et chez des vecteurs (poux, puces, tiques, acariens).

III - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Ce sont des éléments cocco-bacillaires très petits, à la limite de la visibilité en microscopie optique, rosé pâle à la coloration de Gram, polymorphes, intracellulaires le plus souvent, à Gram négatif. La coloration de Macchiavello modifiée par Gimenez (fuchsine - vert malachite) permet de voir les rickettsies colorées en rouge vif sur un fond cytoplasmique vert pâle.

En microscopie électronique, la structure des *Rickettsia* est celle des bactéries à Gram négatif.

B - Caractères cultureux

Les rickettsies se multiplient par division binaire à l'intérieur de la cellule-hôte. Immédiatement après la division (microcinéma) et lorsque les conditions de nutrition sont bonnes, les rickettsies sont animées de mouvements rapides et parcourent le cytoplasme de la cellule-hôte en tous sens. Lorsque le milieu s'appauvrit la division s'arrête, la bactérie s'allonge et l'on obtient des formes filamenteuses.

Les rickettsies ont des stratégies de multiplication intracellulaire qui peuvent être dressées en 3 groupes :

- les bactéries du genre *Rickettsia* vivent libres dans le cytoplasme après un échappement extrêmement rapide de la vacuole de phagocytose.
- les bactéries du genre *Ehrlichia* inhibent (comme *Chlamydia* et *Legionella*) la fusion phagolysosomiale et se multiplient dans le phagosome sous forme de morulae.

- *Coxiella burnetii* n'inhibe pas la fusion phagolysosomiale, et se multiplie dans le phagolysosome à pH acide.

Les relations avec les membranes de la cellule hôte sont importantes pour le développement de certaines espèces, en particulier pour *R. tsutsugamushi* qui demande une association étroite à la membrane pour assurer son métabolisme alors que pour *R. prowazekii*, il existe un développement libre intracytoplasmique grâce à l'action vraisemblable d'une phospholipase A.

C - Caractères antigéniques

L'étude des antigènes est difficile en raison de la fragilité des rickettsies et des difficultés rencontrées pour séparer la bactérie de la cellule hôte.

Les études concernant le matériel antigénique ont été réalisées très généralement à partir de cultures réalisées sur la membrane vitelline d'œufs de poule embryonnés morts 5 à 6 jours après l'inoculation. La fraction antigénique la plus importante est retrouvée dans l'extrait lipidique étheré. Cet antigène permet de séparer trois groupes :

- Groupe 1 : *R. prowazekii*, *R. typhi*
- Groupe II : *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. australis*, *R. sibirica*, *R. akari*, *R. japonica*
- Groupe ni : *R. tsutsugamushi*

Les différentes espèces peuvent ainsi être séparées par des immunosérums spécifiques. Il est intéressant de noter que ces groupes séparent des espèces qui ont un pouvoir pathogène commun et ainsi trois groupes sont individualisés :

Groupe 1 : rickettsies du typhus (pou, puce), ayant une homologie génétique supérieure à 90 % (*R. typhi*, *R. prowazekii*) et un lipopolysaccharide commun croisant avec *Proteus* OX19.

Groupe II : fièvres boutonneuses transmises par les tiques : rickettsies du groupe boutonneux dont le LPS est aussi commun, croisant avec *Proteus* OX19 et OX2 et ayant une homologie génétique supérieure à 90 %.

Groupe III : fièvres des broussailles : les rickettsies de ce groupe ont une communauté antigénique avec *Proteus* OX K mais ce groupe a une hétérogénéité antigénique et génétique considérable.

L'immunofluorescence permet de mettre en évidence différents sérotypes dont l'étude est particulièrement intéressante au sein du groupe II.

La plupart des antigènes rickettsiens intéressants du point de vue immunogène sont des protéines membranaires. On connaît deux protéines majeures chez *R. conorii* (115 kDa et 135 kDa thermostables) *R. typhi* et *R. prowazekii* (120 kDa). L'analyse de la structure de cette protéine de 120 kDa devrait permettre d'en distinguer les épitopes, en particulier les sites de reconnaissance des lymphocytes T. Ces études et la construction de peptides synthétiques laissent entrevoir la possibilité d'exploiter leurs propriétés immunogènes en vue de fabriquer des vaccins.

D - Résistance

Les rickettsies sont des germes très fragiles, facilement tués par la chaleur 30 minutes à 56°C, la dessiccation et la plupart des désinfectants : formol, phénol. Leur viabilité au sein de cellules infectées dépend de la température.

E - Pouvoir pathogène expérimental

Le spectre d'activité pathogène des rickettsies est très large et de très nombreux animaux ont été utilisés pour leur étude. Le cobaye mâle est l'animal de choix en raison de sa sensibilité à la plupart des rickettsies (et des *Coxiella*) et du gonflement

scrotal que l'on observe chez l'animal infecté. On observe un effet dermonécrotique après injection intra-dermique et un effet léthal rapide après injection IV. La souris est moins sensible ; cependant elle est préférable au cobaye pour *R. akari* et pour *R. tsutsugamushi*. L'injection intrapéritonéale à ces animaux permet la multiplication et l'isolement de ces germes.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

A - Groupe du typhus

Les épidémies de typhus ont été connues depuis longtemps mais l'importance des arthropodes dans leur transmission ne fut mise en évidence qu'en 1909 par Nicolle.

Deux espèces sont en cause :

- R. prowazekii* : typhus épidémique exanthématique ou typhus historique ;
R. typhi : typhus endémique ou typhus murin.

J. Typhus épidémique

Il survient par épidémies en particulier lors des guerres. La maladie est caractérisée par :

- une fièvre 40°C à 41°C, restant en plateau 2 semaines,
- une éruption généralisée à partir du 4^e au 7^e jour respectant le visage,
- un syndrome typhique, maximal 2 à 3 jours après l'éruption : prostration, torpeur, stupeur.

Il existe une toux sèche et une respiration laborieuse. Les formes graves sont mortelles, mais, si la guérison survient, il n'y a pas de séquelles. Les antibiotiques ont totalement modifié cette évolution.

La maladie est devenue rare dans sa forme épidémique, mais elle a été un des grands fléaux historiques accompagnant les famines, les guerres et jouant, par les morts qu'elle entraînait, un rôle politique majeur. Ainsi, Napoléon, en 1812, perdit un demi million d'hommes et ce fut l'une des raisons de sa défaite finale. Le typhus fut également important en Russie et en Serbie pendant la Première guerre mondiale ; pendant la Deuxième guerre mondiale il toucha les camps de prisonniers, il se répandit en Corée et au Japon.

Le risque existe toujours et une épidémie peut survenir dès que se trouvent réunies diverses conditions : rassemblement de populations déplacées dans des conditions d'hygiène mauvaises ou nulles, accentuation par la misère et le froid.

R. prowazekii apparaît dans le sang du malade au début de la période fébrile. Les **poux** de corps se nourrissent de son sang et ont tendance à le quitter pour chercher un autre hôte qui va contracter le typhus. Le pou abandonne des fèces riches en rickettsies sur la peau et c'est lors des grattages que les rickettsies pourront pénétrer la peau ainsi altérée.

Il existe quelques cas autochtones aux USA **transmis par les** ectoparasites des écureuils volants : c'est le typhus sporadique.

2. Maladie de Brill-Zinsser

En 1898 Brill, à New-York, note l'apparition de cas sporadiques d'une maladie ressemblant au typhus dans des communautés d'émigrés en provenance d'Europe Centrale, mais ne trouve pas de vecteur.

Zinsser, en 1937, a avancé qu'il s'agissait d'une résurgence de rickettsies persistant dans la peau chez d'anciens typhiques. Plus tard en 1951, Murray a pu isoler des rickettsies, *R. prowazekii*, dans le sang de ce type de malades.

La maladie ressemble au typhus, mais est caractérisée par une intensité moins marquée des manifestations cliniques.

3. *Typhus murin* ou *typhus endémique*

Longtemps confondu avec le typhus historique, il est dû à *R. typhi* et l'arthropode vecteur n'est pas le pou mais la **puce**. Le réservoir de germe est le *rat*.

Maladie comparable au typhus historique mais de moindre gravité : symptômes moins sévères, exanthème moins important, la courbe de température présente de grandes oscillations, la guérison est sans séquelles.

Le typhus murin est exceptionnel en France et a pu se rencontrer dans les ports ou les localités où les rats étaient infectés.

Sa répartition est très mal connue. **Il existe un état endémique au Texas et en Grèce** (île d'Eubée).

B - Groupe des fièvres pourprées et boutonneuses

Ce groupe correspond à de nombreux tableaux cliniques, chacun étant liée à une *Rickettsia* dont la dénomination est particulière rappelant le lieu géographique où la maladie a été décrite. Elles peuvent se rencontrer en France sous la forme de la fièvre boutonneuse méditerranéenne et en Amérique sous la forme de la redoutable maladie des Montagnes Rocheuses.

1. *Fièvre pourprée des Montagnes Rocheuses*

Décrite en 1899, elle est caractérisée par une forte température accompagnée de délire et d'éruption de papules rouge violet évoquant une rougeole sévère. Le début est brutal marqué par des céphalées intenses en particulier dans la région frontale, douleurs musculaires aiguës. Avant les antibiotiques, le pronostic était sévère avec 20 % de mortalité surtout chez les vieillards ; actuellement elle est estimée à 4 % aux USA.

R. rickettsii agent de la fièvre pourprée est transmise par des tiques : *Dermacentor andersoni* (région des Rocheuses), *D. variabilis*, *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis leporis-palustris* au Mexique, *Rhipicephalus sanguineus* qui sont trouvées chez les animaux sauvages, en particulier chez les rongeurs, mais également chez le gros bétail et chez les animaux domestiques. L'infection peut toucher en particulier les bûcherons et les promeneurs en forêt. Elle ne se rencontre pas seulement dans les Montagnes Rocheuses, mais sur tout le continent américain suivant le cycle de développement des tiques. Actuellement cette infection est plus fréquente sur la côte Est que sur la côte Ouest.

2. *Fièvre boutonneuse méditerranéenne*

Elle est due à *R. conorii*. L'épidémiologie de cette rickettsiose est étroitement liée à celle des tiques qui la transmettent, *Rhipicephalus sanguineus*, parasite habituel du chien domestique. **La tique** s'infecte en piquant des mammifères parasités (domestiques : chiens, bovins, ovins, caprins ou sauvages : lapins ou autres rongeurs) et constitue elle-même un réservoir de virus puisqu'elle transmet la rickettsie à sa descendance par voie transovarienne.

L'homme contracte la maladie surtout au printemps et en été à la faveur d'une promenade à la campagne. **Le bassin méditerranéen** constitue le plus important foyer, mais d'autres régions de France peuvent être touchées. La contamination se fait par la salive de l'arthropode. La muqueuse oculaire représente une autre porte d'entrée.

Du point de vue clinique, l'incubation dure 4 à 15 jours. La fièvre est élevée associée à un syndrome algique diffus (céphalées, myalgies). La lésion initiale est caractéristique : tache noire, petit ulcère avec un centre noir nécrotique et une

bordure érythémateuse accompagnée d'adénopathies. Un érythème maculo-papulaire généralisé touchant les membres avec atteinte des paumes et des plantes des pieds est également observé.

Dans le midi de la France cette affection ancienne appelée « maladie d'Olmer » avait reçu le nom évocateur de « typhus des vendanges ». Des formes malignes avec parfois une évolution défavorable ont été décrites, marquées par une éruption purpurique et des atteintes polyviscérales, des complications neurologiques, hépatiques, cardiaques, vasculaires et bronchopulmonaires.

3. *Rickettsiose vésiculeuse*

Elle est due à *R. akari*. Le cycle épidémiologique comprend la souris et un acarien (*Dermanyssus sanguineus*) qui infecte accidentellement l'homme par morsure. Elle est de répartition mondiale : Russie, Amérique, Afrique.

C - Groupe du typhus de Brousse

La maladie est limitée à l'Extrême-Orient : Japon, Australie, Nouvelle-Guinée, Inde. Elle est due à *R. tsutsugamushi* (*R. orientalis*). Elle est transmise par un *Trombicula*.

La fièvre fluviatile japonaise ou scrub-typhus de Malaisie ou typhus des broussailles est une fièvre exanthématique qui apparaît une dizaine de jours après la piqûre par la larve de l'acarien qui, à ce stade de son développement, doit faire un repas sanguin. La fièvre dure deux semaines. Les autres signes sont : escarre au point d'inoculation, adénopathie satellite, céphalées fréquentes et très vives, toux fréquente.

D - Physiopathologie

L'expression clinique des rickettsioses parfois polymorphe fait intervenir des facteurs liés à l'hôte et aux bactéries. La gravité des rickettsioses est variable et la même maladie peut être bénigne ou fatale sans que l'on puisse faire de différences entre les souches responsables de ces formes. L'âge, un déficit congénital en G6 - PD, l'éthylisme aggravent les rickettsioses, mais le rôle d'une baisse des défenses immunitaires n'a pas été prouvé. Les médiateurs chimiques de la réaction inflammatoire pourraient jouer un rôle.

Les rickettsioses sont très virulentes car quelques bactéries (environ 10/piqûre) suffisent à induire une maladie. Généralement elles se multiplient localement, gagnent les ganglions satellites, puis le sang. Elles sont alors capables de parasiter les cellules de l'endothélium vasculaire de tous les tissus : peau, système nerveux central, myocarde, créant ainsi une vascularite qui explique les signes cliniques de la maladie : exanthème, céphalées, stupeur, collapsus cardio-vasculaire, splénomégalie, pneumonie.

V - DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE DES RICKETTSIOSES

A - Direct

L'isolement se fait par inoculation directe par voie intrapéritonéale au cobaye du sang ou autres produits pathologiques provenant du malade. Inoculation presque au lit du malade en raison de la fragilité des germes.

L'isolement du sang de *R. conorii* peut se faire assez aisément par une technique de centrifugation sur fibroblastes humains (HEL, MRC5). Le risque de l'isolement de *R. conorii* n'est pas supérieur à celui du virus grippal.

La culture des autres rickettsies sur différentes lignées cellulaires ou l'oeuf embryonné, ne peut se réaliser que dans des laboratoires équipés et spécialisés (laboratoire de confinement) de classe 3. De nouvelles approches diagnostiques font appel aux sondes moléculaires et l'amplification génomique (Polymerase Chain Reaction : PCR). L'oeuf embryonné peut également être utilisé. L'identification est réalisée par immunofluorescence à l'aide d'immunsérums spécifiques.

B - Diagnostic indirect

7. Réaction de Weil-Félix

Weil et Félix avaient isolé un *Proteus* à partir de l'urine d'un malade atteint de typhus pensant qu'ils avaient affaire à l'agent pathogène, ils ont réalisé une réaction d'agglutination avec le sérum du malade qui se révéla positive. Cette méthode ancienne est abandonnée manquant de sensibilité et de spécificité. Elle reposait sur les communautés antigéniques entre *Proteus* OX 19 - OX K - OX 2 et les rickettsies sauf *Coxiella burnetii*.

2. Microagglutination de Giroud

Cette technique consiste à mettre en présence des suspensions de rickettsies avec le sérum décomplémenté du malade. Elle tend à être abandonnée.

3. Réaction de Fixation du Complément

Elle utilise un antigène soluble extrait par l'éther — réaction spécifique et sensible réalisée avec chacun des groupes : typhus, fièvres boutonneuses et fièvre **Q**, taux parfois peu élevés.

4. Immunofluorescence indirecte

Réaction sensible et dont l'usage se développe pour faire le diagnostic de : fièvre Q, fièvre boutonneuse, typhus murin. Des antigènes rickettsiens prêts à l'emploi sont commercialisés. C'est actuellement la méthode de référence de l'OMS et il faut rechercher systématiquement les anticorps de classe IgG et IgM. Des réactions croisées donnant des faux positifs s'observent exclusivement avec les IgM (*Proteus*, *Legionella*).

5. Hémagglutination indirecte - Test au latex

L'antigène est représenté par un complexe protéines-hydrates de carbone de *R. rickettsii* traité par la chaleur en milieu alcalin. Techniques plus simples et rapides, commercialisées.

VI - LA FIÈVRE Q - *COXIELLA BURNETII*

Coxiella se distingue des *Rickettsia* par sa plus grande résistance aux agents extérieurs et par des caractères antigéniques différents.

Les *Coxiella* ont des caractères de structure de bactéries à Gram négatif.

La résistance est très grande et les *Coxiella* peuvent survivre plusieurs mois à la température du laboratoire, sur des vêtements ou en suspension dans le lait (paille, fumier, placentas desséchés infectés).

La fièvre Q ou Query fever est une zoonose de répartition mondiale. *C. burnetii* est responsable d'avortement épizootique et de mortinatalité chez le bétail. Rongeurs, ovins, caprins, bovins constituent le réservoir de virus. L'homme se contamine

directement à leur contact (par le lait, les dérivés contaminés) mais aussi par les poussières. La transmission par des arthropodes vecteurs est tout à fait négligeable. La contamination se fait par voie aérienne ou muqueuse. Professions exposées : agriculteurs, vétérinaires, employés d'abattoirs, bouchers.

A - Clinique

Après une incubation de 2 à 3 semaines, le début est brutal. La maladie a les caractères suivants : céphalées, fièvre à 39°C en plateau puis courbe en dents de scie, rechutes fréquentes, sueurs profuses, asthénie, localisation pleuro-pulmonaire avec signes de broncho-pneumonie et infiltrats mal délimités, allure de pneumopathie atypique.

Les complications sont rares. La guérison survient vers la troisième semaine, mais fatigue et asthénie persistent longtemps. L'endocardite de la fièvre Q a une incidence probablement sous estimée, se présentant comme une endocardite subaiguë ou chronique à hémoculture négative.

Ce tableau clinique peu spécifique, peut donc faire évoquer toute autre pneumonie atypique ou encore faire penser à une brucellose étant donné le contexte épidémiologique. L'incidence de cette zoonose est méconnue en France.

B - Physiopathologie

Le statut immunitaire de l'hôte semble déterminant dans l'expression clinique de la fièvre Q. Des cas de fièvres Q ont été rapportés en liaison avec une immunodépression (hémopathie, cancer, infection VIH, transplantation). Le LPS jouerait un rôle dans le déterminisme de la maladie. *C. burnetii* est caractérisée par un phénomène de variation de phase. La phase I est la forme sauvage et virulente, la phase II est atténuée et obtenue par passages successifs au laboratoire. Le LPS phase I ne permet pas la fixation de la fraction C₃ du complément et a une action protectrice de la lyse.

C - Diagnostic

Il repose sur la mise en évidence du germe. *C. burnetii* peut être cultivée à partir de produits de biopsie (foie, peau, valves) ou de sang. Les méthodes possibles sont l'inoculation au cobaye et la culture sur oeuf embryonné. Les cultures cellulaires présentent des risques de contamination du personnel de laboratoire et toutes ces recherches doivent être réservées à des laboratoires spécialisés. Toutefois les cultures cellulaires sont beaucoup moins dangereuses que les animaux qui excrètent *C. burnetii*.

C. burnetii peut être révélée par immunofluorescence directe dans les produits pathologiques.

La PCR permettra également de détecter le génome bactérien et de distinguer les souches responsables de formes aiguës et de formes chroniques à l'aide de deux jeux de primers, l'un détectant l'ADN de *C. burnetii*, l'autre une séquence plasmidique caractéristique des souches de forme chronique.

La sérologie reste toutefois le moyen le plus fiable et le plus facile :

- réaction de fixation du complément avec les deux antigènes de phase I et II. La réponse est cependant tardive et manque de sensibilité, les anticorps anti-phase n sont plus précoces mais l'existence d'anticorps anti-phase I est utile dans le diagnostic d'endocardites ;
- l'immunofluorescence indirecte est sensible et spécifique, la séparation IgG, IgM, IgA affine le diagnostic en particulier une augmentation des anticorps de type IgA est souvent spécifique des endocardites ;
- une technique ELISA est proposée.

VII - TRAITEMENT DES RICKETTSIOSES ET DE LA FIÈVRE Q

A - Traitement curatif

Il repose sur des antibiotiques à pénétration intra-cellulaire :

- tétracyclines et en particulier doxycycline, minocycline ;
- le chloramphénicol peut également être utilisé ;
- la rifampicine, l'érythromycine et la ciprofloxacine ont été préconisées.

B - Traitement préventif et prophylaxie

Mesures antiparasitaires : différentes suivant le réservoir de virus et les vecteurs ; en présence de typhus, lutte contre les poux, les puces et les rats (dératisation des ports et des navires). Il n'y a pas encore de vaccin efficace pour les fièvres pourprées. Après une succession d'essais "historiques" (Blanc, Baltazard, Laigret, Giroud, Zinsser, Haagen, Cox), un vaccin pour le typhus existe, dérivé des travaux de Cox, préparé à partir d'une suspension de rickettsies cultivées sur oeuf embryonné et formolées.

Pour la fièvre Q : vaccination du bétail, mais la diversité des **sources de** contamination font que ces mesures sont peut-être insuffisantes.

Pour la fièvre boutonneuse méditerranéenne, sachant que la tique ne pique l'hôte que quelques heures après s'y être fixée, il est utile d'inspecter le corps et les vêtements après avoir traversé une zone endémiquement infestée et de vérifier si la tique contient du sang dans son abdomen, preuve de piqûre.

BIBLIOGRAPHIE

BROUQUI Ph., TOGA B., RAOULT D., « La fièvre boutonneuse méditerranéenne en 1988 », *Med. Mal. Infect.* 1988, **18**, 323-328.

CAPPONI M., « Le diagnostic biologique des rickettsioses ». *Méd. Mal. Infect.*, 1972, **2**, 473-479.

LEFEBVRE J., DELLAMONICA P., « Sérodiagnostic de la fièvre boutonneuse méditerranéenne par immunofluorescence indirecte ». *Méd. Mal. Infect.* 1979, **9**, 670-671.

ORFILA J., « Rickettsiales », in *Bactériologie Médicale*, 1989, Le Minor et Véron, éd. Flammarion Médecine Sciences. Paris, pp 1058-1071.

RAOULT D., GALLAIS H., OTTOMANI A., RESCH J., TICHADOU D., DE MICCO Ph., CASANOVA P., « La forme maligne de la fièvre boutonneuse méditerranéenne. Six observations », *Presse Méd.*, 1983, **12**, 2375-2378.

RAOULT D., « Les rickettsioses 1. La fièvre boutonneuse méditerranéenne ; 2. La fièvre Q », *Lettre Infect.* 1986, **1**, 72-74 ; 112-114.

RAOULT D., DRANCOURT M., « Antimicrobial therapy of rickettsial diseases », *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, **35**, 2457-2462.

WALKER D.H., « Rocky mountain spotted fever : a disease in need of microbiological concern », *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, **2**, 227-240.

Chapitre XLI

CHLAMYDIA

HISTORIQUE

En 1906, Haelberstaeder et Von Prowazek découvrent des inclusions dans les frottis conjonctivaux de trachomateux.

En 1964 Moulder montre que ces microorganismes sont des bactéries à développement intracellulaire. Elles ont été désignées tour à tour sous les noms de : *Bedsonia*, *Myagawanella*, néorickettsies...

L'ordre des chlamydiales (du grec = petite casaque) comprenant la seule famille des *Chlamydiaceae* a été créé. Les *Chlamydiaceae* ont été séparées des rickettsies en 1970.

1 - CLASSIFICATION

Le genre *Chlamydia*, au sein de la famille des *Chlamydiaceae*, regroupe trois espèces : *C. trachomatis*, *C. psittaci* et *C. pneumoniae*, antérieurement désignée comme "souches TWAR" (tableau I).

TABLEAU 1

Famille	<i>CHIAMYDIACEAE</i>				
Genre	<i>CHLAMYDIA</i>				
Espèce	<i>TRACHOMATIS</i>			<i>PSITTACI</i>	<i>PNEUMONIAE</i>
Hôte	homme			oiseaux, mammifères, homme	homme
Sérovars	A, B, Ba, C	D, E, F, G, H, I, J, K	L1, L2, L3	nombreux	1
Pouvoir pathogène	Trachome	Infections - génito-urinaires - oculaires - pulmonaires (nouveau-né)	Lymphogranulomatose vénérienne	Psittacose (pneumonie, encéphalite)	Infections broncho- pulmonaires
Transmission	Indirecte	- Relations sexuelles (MST) - mère nouveau-né	Relations sexuelles	voie aérienne	voie aérienne

II - HABITAT ET TRANSMISSION

1. *C. psittaci* infecte les oiseaux et les mammifères. La bactérie est éliminée en abondance dans les fèces des animaux infectés (oiseaux, chats...) et elle est alors présente dans l'environnement. La transmission se fait surtout par voie aérienne par inhalation de poussières contaminées.

2. *C. pneumoniae*, infecte uniquement l'homme et la contamination interhumaine se fait par voie aérienne avec survenue d'épidémies dans des communautés.

2. *C. trachomatis*, a pour hôte exclusif l'homme. Les sérovars A, B, Ba et C responsables du trachome sont transmis le plus souvent indirectement par les mains souillées, les objets, les mouches. Par contre les souches responsables d'infections uro-génitales ou de la lymphogranulomatose vénérienne sont transmises par les relations sexuelles. Les infections oculaires de l'adulte dues à ces souches sont souvent associées à une infection génitale. Le nouveau-né s'infecte au moment de l'accouchement.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Les *Chlamydia* sont des parasites intracellulaires obligatoires qui dépendent, pour leur métabolisme énergétique, de la cellule hôte. Ils se fixent à la surface des cellules sur des récepteurs spécifiques, puis il se produit une endocytose. La vacuole ainsi formée ne fusionne pas avec les lysosomes. La multiplication de la bactérie se fera à l'intérieur de cette vacuole.

Les sérovars A à K de *C. trachomatis* ne se développent que dans les épithéliums cylindriques : ils sont responsables d'infections locales. Les sérovars L1, L2 et L3 envahissent les tissus lymphoïdes et se multiplient dans les macrophages.

C. psittaci se multiplie dans les macrophages et est responsable d'infections généralisées.

Les phénomènes immunitaires mis en jeu dans les infections à *Chlamydia* sont assez mal connus. L'immunité humorale n'empêche pas les recontaminations et l'immunité cellulaire est mal connue. Alors qu'un premier contact avec la bactérie ne donnerait qu'une atteinte bénigne, la répétition des infections chez un même patient serait responsable des symptômes graves observés (salpingites par exemple).

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

A — *C. psittaci* est responsable de la psittacose. C'est une infection pulmonaire de gravité variable, parfois compliquée de manifestations neurologiques (encéphalite).

B - *C. pneumoniae* provoque des infections broncho-pulmonaires, en général bénignes, survenant surtout chez l'adolescent et l'adulte jeune, mais aussi chez les personnes âgées. Ces infections peuvent être graves sur terrain débilisé.

C - *C. trachomatis*

1. Le trachome

C'est une maladie endémique dans les zones inter-tropicales. Liée à la malnutrition, au sous-développement et au manque d'hygiène, elle frappe surtout les enfants. Le trachome touche environ 500 millions d'individus dans le monde et c'est la principale cause de cécité. La maladie est bénigne, mais les infections multiples favorisent l'entretien des lésions et les surinfections bactériennes aboutissant à la destruction de la cornée.

2. Les Maladies Sexuellement Transmises

La lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas Favre est surtout observée dans les pays en voie de développement. Elle débute par un petit chancre indolore, spontanément résolutif, génital ou anal. L'infection des ganglions satellites va se traduire par une adénite avec fistulisation pouvant évoluer vers la chronicité. Les lésions rectales peuvent entraîner un rétrécissement du rectum.

Les autres infections vénériennes dues aux sérovars D à K sont fréquentes dans le monde entier, 75 % des cas concernent les jeunes adultes avant 25 ans dont 10 % au moins seraient infectés. Transmises par les relations sexuelles elles se traduisent :

- chez l'homme par une urétrite subaiguë, survenant 10 à 60 jours après un rapport contaminant. Cette urétrite est souvent asymptomatique. *C. trachomatis* est le principal responsable d'épididymite aiguë. Des prostatites chroniques et des rectites sont également possibles.
- chez la femme, l'infection se traduit par une cervicite souvent discrète. Celle-ci peut se compliquer de salpingite, de péritonite (syndrome inflammatoire pelvien, péri-hépatite ou syndrome de Fitz-Hugh-Curtis). Ces infections hautes sont responsables de stérilités et de grossesses extra-utérines.

C. trachomatis a également été impliqué dans le déclenchement de syndromes de Fiessinger-Leroy-Reiter (atteintes urétrales, conjonctivales et synoviales) plus fréquent chez les sujets masculins appartenant au groupe HLA B 27.

- les infections du nouveau-né surviennent au moment du passage dans la filière génitale infectée. Elles se traduisent par une conjonctivite survenant dans les 5 à 15 jours après l'accouchement ou par une pneumonie observée après 1 à 3 mois.

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Morphologie

Ce sont des bactéries (elles contiennent ADN et ARN) immobiles à Gram négatif. Elles possèdent une membrane externe, contenant un lipopolysaccharide, mais sans acide muramique. La bactérie se présente sous deux formes :

- Les **corps élémentaires**, particules infectieuses, qui n'ont aucune activité métabolique. Ils sont de petite taille (0,3 µm), sphériques (*C. trachomatis*, *C. psittaci*) ou en forme de poire (*C. pneumoniae*) avec un appareil nucléaire condensé en périphérie du cytoplasme.
- Les **corps réticulés**, formes métaboliquement actives, intracellulaires, qui se multiplient par division. De taille plus importante (environ 1 µm) ils n'ont pas de structure membranaire rigide. L'appareil nucléaire forme dans le cytoplasme une trame lâche. En fin de cycle, ils se transforment en corps intermédiaire qui donne ensuite les corps élémentaires. Ceux-ci s'accumulent au centre de la vacuole intracytoplasmique.

Avec *C. trachomatis*, une seule vacuole est présente dans la cellule, volumineuse, elle repousse le noyau en périphérie. Elle renferme relativement peu de corps bactériens et contient du glycogène. Par contre avec *C. psittaci* et *C. pneumoniae*, il peut y avoir plusieurs inclusions en même temps. Celles-ci sont denses et ne déforment pas le noyau.

En fin de cycle ces inclusions se rompent et libèrent les corps élémentaires qui vont à leur tour infecter de nouvelles cellules. Le cycle de multiplication *in vitro* varie de 36 heures pour *C. psittaci* à 72 heures pour *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*.

B - Structure antigénique

La structure antigénique des *Chlamydia* est complexe et les antigènes ont des spécificités de genre, d'espèce et de type (Tableau II).

TABLEAU II
PRINCIPAUX ANTIGENES DES *CHIAMYDIA*

Antigène	Localisation	İM	Spécificité antigénique
LPS : lipopolyoside	Feuillet interne de la membrane externe des CE et CR (Ct, Cps, Cpn)	40 kDa	Réactivité croisée avec le LPS de certaines entérobactéries Spécificité de genre et de type
Protéine majeure de membrane externe	Surface des CE et CR (Ct, Cps, Cpn ; 60 % des protéines membranaires)	38 à 45 kDa selon spp	Spécificité de genre, d'espèce, de sous espèce et de type
Antigène (s) soluble (s) glycolipidique (s)	Périphérie des cellules hôtes et des CE	?	Spécificité de genre
Protéine 74 kDa	Paroi des CE (Ct)	74 kDa	Spécificité d'espèce
Protéine 75 kDa	Paroi des CE (Cpn)	75 kDa	Spécificité d'espèce
Eucaryotic cell binding protein	Surface des CE (Ct, Cps)	18 kDa (Q) 31 kDa (Cp)	Spécificité d'espèce
Cystein rich proteins	Membrane externe des CE (Ct, Cps)	62 kDa, 60 kDa 15 kDa	Spécificité d'espèce et de type
Protéine thermolabile	Périphérie des CE (Ct)	15 kDa	Spécificité d'espèce
Protéine inconnue	Périphérie des CE et CR (Ct)	27 à 32 kDa	Spécificité de type

CE = Corps élémentaires ; CR = corps réticulé ; Ct = *Chlamydia trachomatis* ; Cps = *Chlamydiopsittaci* ; Cpn = *Chlamydia pneumoniae*

1. Les antigènes de genre

Il existe un lipopolysaccharide commun aux trois espèces, présent dans la paroi externe et thermostable. Il présente des analogies de structure avec celui de *Salmonella* ainsi que des réactions antigéniques croisées avec les formes rough.

2. Les antigènes d'espèces

Le plus important est la protéine majeure de membrane externe qui jouerait un rôle de porine ; elle permet de différencier les espèces entr'elles et est utilisée pour l'élaboration d'anticorps monoclonaux.

3. Les antigènes spécifiques de types

Ils permettent de différencier les 15 sérotypes de *C. trachomatis* et les multiples sérovars de *C. psittaci*. Jusqu'à présent, un seul sérovar de *C. pneumoniae* est connu.

VI - DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

A - Les prélèvements

La qualité du prélèvement conditionne le résultat de la recherche de *Chlamydia*. Il est important de ramener des cellules qui contiennent les corps bactériens ce qui est réalisé par un grattage de la muqueuse.

1. En cas d'infection pulmonaire

Quelque soit l'espèce de *Chlamydia* en cause, un simple écouvillonnage du rhinopharynx suffit. On pourra également utiliser des crachats, des aspirations bronchiques ou les lavages broncho-alvéolaires.

2. Dans les infections uro-génitales et oculaires

Il faut faire un frottis de la muqueuse. On pourra utiliser un écouvillon en dacron, en coton ou en plastique.

Chez l'homme, ce prélèvement sera fait dans l'urètre sur 3 à 4 cm sans faire saigner, le matin avant la miction.

Chez la femme, le prélèvement sera fait dans l'endocol après nettoyage pour enlever l'excès de glaire. La sensibilité du prélèvement peut être augmentée en faisant simultanément un frottis du méat urinaire.

En cours de coelioscopie, on peut être amené à faire des frottis de trompes ou de la cavité péritonéale, ou des recueils de liquides présents dans le cul-de-sac de Douglas.

Pour le diagnostic de rectite à *Chlamydia* on pratique des frottis de muqueuse rectale.

Dans les conjonctivites, les prélèvements seront effectués dans les sillons conjonctivo-palpébraux.

3. Au cours de la lymphogranulomatose vénérienne

Le ganglion infecté, s'il n'est pas fistulisé, sera ponctionné. Sinon il faudra faire un prélèvement de pus.

4. Traitement des échantillons

Pour une recherche directe sur lame, il faut faire un frottis, pas trop épais, puis fixer la lame au méthanol.

Pour les techniques de recherche d'antigène par méthodes immunoenzymatiques, des milieux de transport permettant la conservation du prélèvement pendant 8 jours à +4°C sont utilisés.

Pour la mise en culture, il faut déposer le prélèvement dans du milieu hypersaccharosé, tamponné (milieu 2 SP). Si la mise en culture est faite dans les 24 heures, ce milieu est conservé à +4°C, si la culture doit être retardée, il faut congeler rapidement le prélèvement à -80°C.

B - Diagnostic direct

1. Recherche sur frottis

a) Colorations

La recherche directe sur frottis peut se faire après coloration au Lugol pour la recherche de *C. trachomatis* : les inclusions apparaissent en brun violacé sur fond brun jaune. Cette technique, peu onéreuse est peu sensible et réservée au dépistage du trachome. La coloration de Giemsa est de même très peu sensible, et les inclusions sont difficiles à mettre en évidence : celles de *C. trachomatis* apparaissent claires avec à l'intérieur des granulations basophiles ; celles de *C. pneumoniae* et de *C. psittaci* sont violet foncé, très denses.

β) Immunofluorescence directe

C'est une excellente technique qui met en évidence les corps bactériens directement dans les frottis. L'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces permet de faire directement le diagnostic d'infections à *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*. La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont excellentes mais elles nécessitent un observateur expérimenté et elles sont difficilement utilisables pour de grandes séries de prélèvements.

2. Recherche d'antigène dans le prélèvement

Ce sont surtout des techniques immuno-enzymatiques qui sont utilisées. Elles mettent en jeu des anticorps polyclonaux ou monoclonaux qui n'ont pas de spécificité d'espèce. Seuls les prélèvements génitaux et oculaires peuvent être examinés ce qui limite leur emploi à la recherche de *C. trachomatis*. Ces techniques sont sensibles mais peuvent fournir des résultats faussement positifs. L'utilisation de réactifs de confirmation permet de limiter ces erreurs.

Automatisables, ces techniques sont indiquées pour le dépistage. Il existe également une technique utilisant la chimiluminescence qui est plus rapide.

Les méthodes de biologie moléculaire (utilisation de sondes d'ADN ou d'amplification en chaîne par polymérase) pourraient remplacer les méthodes précédentes dans un proche avenir.

3. Recherche directe par mise en culture

a) Culture sur oeuf embryonné

L'inoculation de l'oeuf embryonné se fait dans la cavité vitelline. Cette technique a permis les premiers isolements de *Chlamydia* et a été utilisée pour la préparation des antigènes pour la sérologie. Actuellement elle est abandonnée au profit de la culture cellulaire.

fi) Cultures cellulaires

C'est la méthode de référence pour la recherche de *Chlamydia*, elle peut être utilisée quelque soit l'espèce et quelque soit le prélèvement. Cependant elle est délicate à mettre en oeuvre et nécessite un matériel coûteux et un personnel entraîné.

Les cellules les plus couramment utilisées sont les souches McCoy (lignées semi-continues d'origine humaine) pour *C. trachomatis* et *C. psittaci* et HeLa (lignée continue) pour les 3 espèces.

C. psittaci et les souches de *C. trachomatis* L1, L2 et L3 sont très virulentes et le tapis cellulaire peut être inoculé directement. Par contre, avec *C. trachomatis* et *C. pneumoniae*, il faut centrifuger le prélèvement avec la culture cellulaire pour faciliter l'adhésion des corps bactériens aux cellules.

Les cellules sont ensuite traitées par la cycloheximide qui bloque les synthèses protéiques de la cellule hôte, en respectant le métabolisme énergétique, ce qui favorise le développement des *Chlamydia*. L'incubation est arrêtée au bout de 2 ou 3 jours. La présence de *Chlamydia* est recherchée avec une réaction immunoenzymatique ou avec des anticorps marqués à la fluorescéine.

N.B. La recherche directe de *C. psittaci* dans les prélèvements doit être effectuée en prenant de grandes précautions pour éviter une contamination accidentelle du personnel.

C - Diagnostic indirect

7. La fixation du complément

Elle utilise l'antigène de groupe (LPS), thermostable. Cette technique est peu sensible mais elle est utilisable dans les infections systémiques (psittacose, lymphogranulomatose vénérienne), dans certaines formes compliquées d'infections à *C. trachomatis* (péritonites) et dans 25 % des infections à *C. pneumoniae*. Cette technique est prise en défaut dans la majeure partie des infections locales, génitales ou pulmonaires.

Une sérologie positive en fixation du complément sera également positive (à un titre d'anticorps identique) en micro-immunofluorescence.

2. La micro-immunofluorescence indirecte

Mise au point par Wang et Grayston, c'est actuellement la technique de référence pour la sérologie des infections à *C. trachomatis*.

Elle permet la recherche d'anticorps dirigés contre les trois espèces de *Chlamydia*. Initialement elle a été utilisée pour le typage des souches isolées. Pour l'immunofluorescence, l'utilisation des 15 sérovars de *C. trachomatis* permet théoriquement de définir le type en cause dans l'infection mais en pratique une seule souche suffit (par exemple la souche L2 appartenant au sérovar D) en raison des multiples réactions croisées entre les différents types. Pour ce diagnostic on utilisera également une souche de *C. psittaci* (souche LOTH) et de *C. pneumoniae* (souche IOL ou TWAR). L'antigène peut être soit des corps élémentaires partiellement purifiés (micro-immunofluorescence), soit des cellules infectées (immunofluorescence sur inclusions). La première méthode est la plus courante.

3. Les techniques immunoenzymatiques

Elles sont également proposées, mais pour le moment il n'y a pas de sérum ni d'antigène de référence pour la sérologie et la comparaison avec la micro-immunofluorescence est difficile. Aussi cette dernière reste préférable.

4. Résultats de la sérologie

La micro-immunofluorescence est une méthode sensible. Cependant son interprétation est difficile. La recherche d'IgM est décevante chez les adultes (elle est par contre essentielle pour le diagnostic d'une infection néo-natale). La mise en évidence d'IgA ne contribue que peu au diagnostic d'infection évolutive. Un titre

d'anticorps très élevé (> 1024) doit faire suspecter une infection compliquée chez la femme, même en l'absence de signes cliniques patents. Une séroconversion est rarement observée, de même qu'une diminution du titre après antibiothérapie. En dehors de ces cas, la sérologie n'apporte que peu de renseignements dans les infections à *C. trachomatis*. En effet, chez les patients les titres n'évoluent que lentement et persistent des années parfois à des titres élevés, même en absence de réinfection. De plus des anticorps anti *C. trachomatis* sont mis en évidence chez 30 à 40 % des patients. D en est de même avec *C. pneumoniae*.

L'utilisation de deux (ou trois) antigènes différents peut dans certains cas indiquer quelle est l'espèce responsable de l'apparition des anticorps, mais les réactions croisées sont nombreuses entre les trois espèces de *Chiamydia* et une différence de titres avec les différents antigènes ne pourra être observée qu'au début d'une infection. Donc la sérologie est de peu d'intérêt pour le diagnostic des infections à *Chiamydia*. Pour tenter d'améliorer son interprétation, des techniques de "Western-blot" (ou immunoréplique) sont actuellement en cours d'étude.

VII - TRAITEMENT

A - Traitement préventif

En l'absence de vaccin la lutte contre les infections à *Chiamydia* passe par l'éducation, le dépistage et l'utilisation de préservatifs pour les maladies vénériennes. La lutte contre le trachome consiste surtout en une amélioration des conditions de vie et d'hygiène.

B - Traitement curatif

Les *Chiamydia* sont sensibles aux antibiotiques qui pénètrent dans la cellule. Dans une infection non compliquée, il faut utiliser en tout premier lieu les tétracyclines, de deuxième génération (doxycycline, limécycline). Chez la femme enceinte, ou chez le nouveau-né ces produits seront remplacés par des macrolides (érythromycine, roxithromycine...).

Les fluoroquinolones pourraient représenter une alternative au traitement des infections à *C. trachomatis*.

Le traitement doit être suffisamment prolongé (15 jours à 3 semaines). Devant une infection vénérienne, il faudra rechercher les partenaires et les traiter.

Chez la femme, une salpingite, un syndrome inflammatoire pelvien, peut amener à utiliser une antibiothérapie associée (amoxicilline + acide clavulanique, métronidazole).

BIBLIOGRAPHIE

- DUTILH B., BEBEAR C., « Diagnostic bactériologique de *Chiamydia trachomatis* par culture cellulaire ». Feuilletts Biol., 1987, 28, 13-17.
- GRAYSTON J. T., CAMPBELL L. A., KUO C. C., et al., A new respiratory tract pathogen : *Chalamjdier pneumoniae* strain TWAR, J. Infect. Dis., 1990, 161, 618-625.
- KUO C.C., « *Chiamydia* spp. strain TWAR. A newly recognized organism associated with atypical *Pneumonia* and other respiratory infections ». Clin. Microbiol. Newlet., 1988, 10, 137-140.
- PUY H., FUENTES V., EB F., ORFILA J., « Caractères biochimiques et structure antigénique des *Chiamydia* ». Ann. Biol. Clin., 1989, 47, 485-491.
- SCHACHTER J., « Overview of *Chiamydia trachomatis* infection and thé requirements for a vaccine ». Rev. Infect. Dis., 1985, 7, 713-716.
- TREHARNE J.D., BALLARD R.C., « Thé expanding spectrum of thé *Chiamydia* - a microbiological and clinical appraisal ». Rev. Med. Microbiol., 1990, 1, 10-18.

Chapitre XLII

ACTINOMYCETES

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des actinomycétales. Certains représentants de ces *Actinomycètes*, surtout parmi les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de leur morphologie, parfois fungoïde. Il s'agit d'un groupe supragénérique, rassemblant des bactéries très diverses, dispersées dans la systématique, où l'on rapproche les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*... Ces actinomycètes sont importants pour le microbiologiste, ce sont les agents de maladies humaines ou animales (actinomycoses, nocardioses, tuberculose, mycétomes...) abondants dans la nature (sols, eaux, composts). Ils jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols, dans la biodégradation des composés organiques voire de polluants (pesticides), dans certaines maladies des végétaux ; ils sont enfin à l'origine de nombreux antibiotiques.

Dans un souci de simplification, et pour la pratique de bactériologie médicale, nous n'envisageons dans ce chapitre que les genres intéressant la pathologie humaine et non décrits dans d'autres chapitres spécifiques : - actinomycètes aérobies (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*) — actinomycètes anaérobies stricts ou facultatifs (*Actinomyces*, *Arachnia*).

HISTORIQUE

L'actinomycose a d'abord été décrite chez le bétail, puis chez l'homme ; la première culture obtenue chez l'homme est due à Israël en 1878.

En 1888, Nocard, vétérinaire français, décrit le farcin, une infection du bétail qui ressemble à une tuberculose chronique.

Eppinger observe en 1890, le premier cas de nocardiose à allure de pseudo-tuberculose associée à des abcès cérébraux.

En 1940, Erickson reconnaît plusieurs espèces parmi les microorganismes anaérobies : *Actinomyces israelii*, *A. bovis*...

Waksman, en 1959, propose une classification distinguant les *Actinomyces* anaérobies stricts ou parfois facultatifs, des *Nocardia* et des agents des mycétomes, aérobies.

1 - CLASSIFICATION

Dans le Bergey's Manual 1986 (vol. 2), les genres *Arachnia* et *Actinomyces* sont classés dans la section des bacilles irréguliers, non sporulés à Gram positif, non pas comme anaérobies stricts, mais comme anaérobies facultatifs en précisant toutefois

que la plupart des espèces poussent mieux dans des conditions d'anaérobiose (du moins à l'isolement).

L'édition 1989 du Bergey's Manual (vol. 4) est entièrement consacrée aux actinomycètes (H.A. Lechevalier).

Les groupes supragénériques des actinomycètes où l'on rencontre **des germes** intéressant directement la bactériologie médicale sont les suivants :

Actinobactéries	Nocardioformes
<i>Micrococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Rothia</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Stomatococcus</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Oerskovia</i>	Streptomycètes
<i>Actinomyces</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Arachnia</i>	
<i>Brevibacterium</i>	
<i>Dermatophilus</i>	
Maduromycètes	
<i>Actinomadura</i>	

II - HABITAT - TRANSMISSION

Les *Actinomycètes* « anaérobies » sont des bactéries commensales obligées des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs (cavité buccale, tube digestif notamment au niveau de l'iléon terminal et du caecum).

Ils font partie de la flore de Veillon.

A la différence des *Actinomycètes* aérobies on ne les trouve pas dans le sol ou les eaux. Toutefois, on note une plus forte incidence dans les milieux ruraux (un rôle vecteur joué par les céréales a été évoqué) et dans la cavité buccale des sujets ayant une mauvaise hygiène bucco-dentaire.

La contamination est le plus souvent endogène, mais des cas après morsure ont été rapportés et de rares cas de transmission orogénitale suspectés.

La porte d'entrée est fréquemment buccale (pyorrhée) ou ORL, parfois gynécologique. Puis il y a formation d'abcès, qui ont tendance à diffuser de façon loco-régionale (par exemple tubo-ovarienne), mais aussi avec parfois dissémination sanguine (portale notamment).

Les *Actinomycètes* « aérobies » sont largement distribués dans les sols, les végétaux, les eaux douces et salées et dans l'atmosphère.

Les nocardioses sont surtout contractées par inhalation, plus rarement par voie digestive ou cutanée.

Dans le cas des mycétomes, on admet généralement que le germe se développe à partir d'une blessure ou d'une piqûre par un élément souillé de terre ou de poussières.

III - PHYSIOPATHOLOGIE

Au cours des actinomycoses, on note au stade initial une infiltration mal limitée, à polynucléaires, puis un ramollissement et fistulisation avec aspect d'abcès froid ou dans les cas typiques un pus à grains jaunes. Les lésions sont avasculaires évoluant par contiguïté, par voie sanguine ou lymphatique, avec aspect de sclérose (limitant les lésions, mais favorisant l'anaérobiose et protégeant les bactéries) et de nécrose. Les lésions peuvent prendre un aspect pseudotumoral. L'élément caractéristique est la

formation de grains jaunes ou blancs : amas mycéliens correspondant à un complexe polysaccharide-protéines riche en calcium.

Les agents des nocardioses et des mycétomes ont un pouvoir pathogène limité, l'évolution est lente et insidieuse, mais peut aboutir à des lésions spectaculaires des tissus mous et des os.

Dans la nocardiose, les filaments bactériens se rencontrent sous forme libre alors que dans les mycétomes on trouve des grains constitués de filaments agrégés dont la couleur peut orienter le diagnostic histologique.

IV - POUVOIR PATHOGÈNE

A - Pour l'animal

N. astéroïdes inoculé par voie veineuse ou péritonéale provoque chez le cobaye des atteintes pluriviscérales et la mort de l'animal en 2-4 semaines, avec présence de grains à l'examen histologique.

Le pouvoir pathogène est difficile à reproduire avec les *Actinomyces* « anaérobies » ; il existe un pouvoir pathogène naturel pour l'animal, *A. bovis* provoquant des lésions cervico-faciales chez les bovidés.

B - Chez l'homme (Tableau I)

TABLEAU I
PRINCIPALES MALADIES HUMAINES DUES A DES *ACTINOMYCETES*

GERMES	MALADIES	GRAINS
1. Actinomyces "anaérobies"		
— <i>Actinomyces israelii</i>	blanc-jaune Actinomycose	
<i>odontolyticus</i>	- cavité buccale	
<i>naeslundii</i>	- région cervico-faciale	
<i>viscosus</i>	— viscères profonds	
— <i>Arachnia propiomca</i>	Actinomycose — canaliculites	
2. Actinomyces aérobies		
— acidorésistants :	Nocardiose	
- <i>Nocardia astéroïdes</i>	- poumons	blanc-jaune 25-150 um
- <i>Nocardiabrasiliensis</i>	- viscères profonds - mycétomes	
	Mycétomes sous-cutanés	
— non acidorésistants		
<i>Actinmadura madwae</i>	Mycétomes - des membres	blanc-rosé 0,5-5 mm
<i>pelletieri</i>	- osseux	rouge 0,3-0,5 mm
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Mycétomes membres, os...	jaune 0,5-2 mm
<i>Dermatophilus congoliensis</i>	Sporotrichose épidémie, derme	
<i>Rothia dentocariosa</i>	Flore buccale. Opportuniste Abscess - endocardites	
<i>Oerskovia turbata</i>	Mal. des griffes du chat ? Endocardites	

1. Les actinomycoses vraies sont sous-estimées du fait de la difficulté :

d'en faire le diagnostic,
de rattacher l'isolement du germe à la pathologie,
de l'association fréquente avec d'autres germes anaérobies **et/ou aérobies.**

Les actinomycoses sont favorisées par divers facteurs :

- traumatismes locaux,
- altération de la muqueuse digestive (os, arêtes...)
- présence de corps étrangers (intra-utérins par exemple)
- terrain immunodéprimé, corticothérapie...

En effet les *Actinomycetes* sont spontanément peu virulents.

Ces actinomycoses sont des **affections polymorphes** pouvant évoluer sur un mode *aigu* ou *chronique* et s'accompagnant de fièvre et d'hyperleucocytose. On distingue schématiquement :

- des formes *cervico-faciales* (50 % des cas). Elles font suite à un foyer ou à une extraction dentaire. Tuméfaction maxillaire ou cervicale ou parotidienne envahissant la peau et évoluant de façon aiguë ou chronique avec sortie de pus à grains jaunes par une fistule ou par le point de ponction ; l'évolution peut se faire vers une ostéite ;
- des formes *thoraciques* (25 % des cas). L'origine est généralement gingivale ou amygdalienne. L'évolution peut prendre un aspect pseudotuberculeux ou pseudotumoral ;
- des localisations *abdominales* plus rares. On retrouve une origine appendiculaire, vésiculaire, une perforation ;
- d'autres formes peuvent se rencontrer : cérébroméningées, oculaires, hépatiques simulant un épithélioma, urogénitales (de plus en plus fréquentes du fait de dispositifs intra-utérins), vertébrales, péritonéales... voire survenant parfois quelques mois après une morsure.

2. Les nocardioses

Elles sont peu fréquentes, mais sûrement en progression. Ces infections cosmopolites sont favorisées par les antibiotiques, les traitements stéroïdiens, les agents cytotoxiques, l'immunodépression, les transplantations d'organes.

- La nocardiose à *N. astéroïdes* est une maladie **essentiellement pulmonaire**. La dissémination se fait par voie sanguine à partir du foyer pulmonaire primaire.
- On rencontre des localisations pleurales, cérébrales, spléniques, rénales, cardiaques, hépatiques...
- des formes sous-cutanées existent ; elles se présentent comme des abcès poly-fistulisés et ulcéreux.

3. Les mycétomes

Ils se rencontrent en zone tropicale et température chaude. On note une prédominance chez les adultes de sexe masculin.

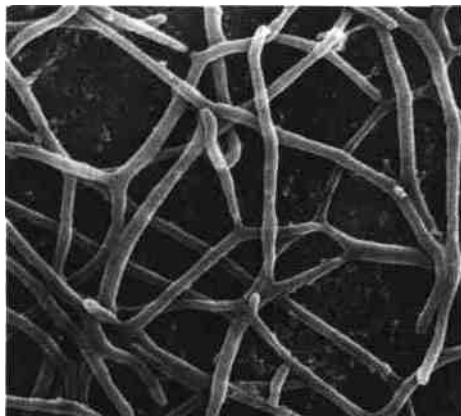
La période d'incubation qui suit le traumatisme peut durer des mois voire des années. L'évolution peut durer jusqu'à 20-25 ans.

L'aspect est celui d'abcès évoquant des **pseudotumeurs** affectant les tissus sous-cutanés. Les lésions granulomateuses peuvent atteindre l'os en le détruisant. Les lésions sont souvent localisées aux pieds d'où le nom de « Pied de Madura » souvent utilisé.

L'étiologie est évoquée par la présence de grains dans le pus (blancs, jaunes ou rouges, de taille variable, pas toujours visibles à l'œil nu).

V - CARACTÈRES BACTÉRIOLOGIQUES

A - Caractères morphologiques



Ce sont des bacilles à Gram positif de 0,2 à 1 μm de large dont la longueur varie de 1,5 à 50 μm pouvant se présenter sous forme de filaments, bacilles ou coccobacilles. Certaines espèces retiennent le Gram soit uniformément, soit de façon irrégulière.

La coloration au bleu de méthylène permet d'observer plus facilement la morphologie des filaments, branchements, (notamment pour *D. congolensis*) organes de sporulation. Certaines espèces (*Th. astéroïdes*, *N. brasiliensis*) sont acidorésistantes quand on utilise une variante de la coloration de Ziehl.

Les différents *Actinomycetes* présentent des différences de composition de leur paroi.

B - Caractères cultureux

1. *Actinomycetes anaérobies*

On utilise des géloses Columbia enrichies de 5 % de sang de cheval, éventuellement additionnées d'acide nalidixique.

Les cultures maintenues en anaérobiose sont examinées après 2 et 7 jours. La croissance est favorisée par le CO_2 .

Après une semaine, les colonies apparaissent opaques, blanches, irrégulières, avec un cratère central en « dent molaire ». Sur gélose, l'examen des colonies jeunes montre des filaments ramifiés : croissance mycélienne caractéristique ; selon les espèces la croissance s'effectue en anaérobiose ou microaérophilie, en anaérobiose stricte ou facultative.

2. *Actinomycetes aérobie*

Les géloses de Sabouraud glucosées représentent le milieu de choix (tubes inclinés, bouchés), mais les géloses au sang permettent également la culture, en aérobie.

Des milieux liquides : thioglycolate, cœur-cerveau permettent un éventuel enrichissement ; dans ces milieux les cultures apparaissent sous forme de voiles, de grumeaux.

A noter que les *Nocardia* peuvent, en partie, résister aux traitements de décontamination des produits pathologiques utilisés pour isoler les mycobactéries ; elles se développent sur Loewenstein. Les colonies apparaissent selon les espèces en 3 à 5 jours, à 37°C, sous 10 % de CO_2 ; ces colonies sont souvent pigmentées, elles sont plates, parfois surélevées en dôme, en pic, elles peuvent être plissées, voire cirueuses ou cérébriformes. L'aspect est parfois duveteux. La morphologie des colonies varie en fait avec l'espèce et l'âge des colonies.

Les cultures sur lame permettent l'observation de mycéliums, filaments ramifiés, et révèlent des formations plus complexes : *N. astéroïdes* avec sporulation de type arthrospores, sporulation en courtes chaînettes...

C - Caractères biochimiques

1. *Actinomycetes anaérobies*

On peut utiliser des galeries API-Anaer, avec des résultats variables, ou la galerie API-Zym à condition d'utiliser des suspensions denses.

On peut aussi recourir aux galeries conventionnelles :

- étude des hydrolyses de la gélatine (Frazier), de l'amidon et de l'esculine, nitrate-réductase, indole, uréase
- étude des fermentations arabinose, glucose, saccharose, maltose, mannose, mannitol, lactose, xylose.

L'analyse des acides gras volatils en chromatographie en phase gazeuse (ac. propionique...) produits en bouillon PGY permet d'apporter un élément de diagnostic différentiel avec d'autres bactéries à Gram positif de la flore de Veillon (*Eubacterium, Propionibacterium,...*).

L'observation de la croissance mycélienne sur lame est un élément d'orientation du diagnostic à ne pas négliger.

Pour *Arachnia propionica*, la mise en évidence de DAP dans la paroi est importante.

Les principaux caractères différentiels figurent sur le tableau II.

TABLEAU n
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES *ACTINOMYCETES*
« ANAÉROBIES »

	<i>Actinomyces</i>				<i>Arachnia propionica</i>
	<i>israelii</i>	<i>odontolyticus</i>	<i>naeslundii</i>	<i>viscosus</i>	
Gram	+	+	+	+	+
Croissance	anaér.	anaér.	anaér.fac.	anaér.fac.	anaér.fac.
Acidorésistance	-	-	-	-	-
Nitrate-réductase	±	+	+	±	+
Catalase				+	-
Glucose	+	+	+	+	+
Xylose	+	±	±	-	-
Mannitol	±	-	-	-	+
Uréase			+	±	-
ac.propionique	-				+
LL-DAP	-	-	-	-	+

anaér. : anaérobie

fac. : facultatif

2. *Actinomycetes aérobies*

Pour l'identification des principales espèces, on étudie les caractères suivants :

- hydrolyses de la gélatine, caséine, tyrosine, xanthine, adénine et esculine, nitrate-réductase, uréase,
- recherche de l'acidification de l'arabinose, xylose, rhamnose, adonitol, lactose, mannitol... Les caractères différentiels figurent dans le tableau III.

L'utilisation de milieux de culture à la paraffine pour l'isolement des *Streptomyces* et des *Nocardia* à partir des produits pathologiques, la mise en évidence des acides mycoliques à (C₄₀-C₆₀) de paroi des *Nocardia* (CLHP, CPG) et des isomères de l'acide diaminopimélique (DAP) en chromatographie sur couche mince de cellulose (*Nocardia* : méso-DAP, *Streptomyces* : LL-DAP), constituent les éléments du diagnostic de genre.

TABLEAU m
PRINCIPAUX CARACTÈRES D'IDENTIFICATION DES *ACTWOMYCETES* AÉROBIES

	<i>Nocardia astéroïdes brasiliensis</i>		<i>Actinomadura madurae pelletieri</i>		<i>Streptomyces somaliensis</i>	<i>Dermatophilus congolensis</i>
	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie
Gram	+	+	+	+	+	+
Croissance	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie	aérobie
Acidorésistance	±	±	-	-	-	-
Nitrate-réductase	+	+	+	+	-	-
Catalase	+	+	-	-	-	+
Glucose	+	+	+	+	-	+
Xylose	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	±	±	±	+
Caséine	-	+	±	-	+	+
Uréase	+	+	-	-	-	+
Utilisation de la paraffine	+	+	-	-	-	-
Acides mycoliques	+	+	-	-	-	-
DAP	més0	més0	-	-	LL	més0

VI DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

A Prélèvements

- pus de fistules ou de ponctions (pleurale, osseuse...) ; pus divers : ORL, lacrymaux, pelviens, abdominaux...
- biopsies : pulmonaires...
- peropératoires (pseudotumeurs), voire post-mortem.
Pour Brown, 88 % des diagnostics sont établis grâce à la chirurgie.

B - Examen du pus

L'aspect du **pus avec des grains**, l'aspect et la couleur de ceux-ci (quand ils existent) peut faire évoquer le diagnostic.

1. Anatomo-pathologie

Cet examen permet parfois d'évoquer, voire d'affirmer pratiquement le diagnostic d'actinomycose, même si classiquement seule la bactériologie permet la confirmation du diagnostic.

Dans les lésions (tuméfaction fluctuante, aspects pseudotumoraux), deux éléments caractéristiques sont retrouvés de façon quasi constante :

- le follicule actinomycosique avec une zone centrale riche en polynucléaires altérés, et nécrose, et à la périphérie un tissu vasculaire infiltré de cellules inflammatoires,
- le grain actinomycosique, situé au centre de cette réaction inflammatoire non spécifique. Il est ovalaire, arrondi, parfois polylobé, fissuré ou fragmenté, d'une taille de 10 à 30 μm . Ces grains sont colorables au PAS.

D'autres colorations sont utilisées hémalun-éosine-safran, Gram, coloration à l'argent (Gomori-Grocott).

2. Bactériologie

- L'examen direct est indispensable, il permet :
- d'évoquer un *Actinomycetes* (aspect filamenteux, ramifié, avec renflements...),
- de préciser l'aspect mono ou polymicrobien du pus.

On a recours aux colorations de Gram, Giemsa, Ziehl-Neelsen, PAS.

- La culture comporte l'ensemencement en parallèle :
- de milieux d'enrichissement liquides (milieu au thioglycolate, milieux TGY ou PGY additionné de sérum, coeur-cervelle
- de milieux solides en boîte (gélose Columbia au sang de cheval, gélose au sang à l'acide nalidixique, gélose VCF...) placés pour les uns en aérobose, pour les autres en anaérobiose. Parallèlement on ensemence des milieux en tube : Sabouraud glucose et milieu de Loewenstein. Incubation à 37°C, surveillance durant 3 semaines. On effectue une culture sur lame pour observer au 40 x 10 sur le bord des colonies jeunes la morphologie filamenteuse ramifiée.

Une fois la souche pure obtenue, on procède à une vérification de la morphologie, des caractères aérobie ou anaérobie, puis on procède à une identification grâce aux caractères biochimiques, voire antigéniques dans le cas d'*Actinomyces israelii*.

Il n'existe pas de sérodiagnostic. Les anticorps fixant le complément et précipitants ne sont pas spécifiques.

VII - TRAITEMENT

La chirurgie précède souvent le traitement médical, car le diagnostic n'est parfois posé que sur le seul examen anatomo-pathologique post-opératoire.

La base du traitement est l'antibiothérapie seule ou associée à la chirurgie.

A - Anaérobies

La pénicilline G est l'antibiotique le plus utilisé, éventuellement en association avec le probénécide. A noter que des souches d'*A. israelii* résistantes à la pénicilline G ont été isolées lors de traitements prolongés.

En cas d'allergie, on a recours aux tétracyclines, lincomycine, clindamycine, voire au chloramphénicol.

Les *Actinomyces* sont résistants au métronidazole, l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole a une action irrégulière, les aminosides sont inactifs.

Les traitements doivent être intensifs et prolongés plusieurs semaines.

B - Aérobies

1. *Nocardia, Actinomadura et Streptomyces*

Nocardia et *Streptomyces* sont des germes multirésistants aux antibiotiques (la majorité des B-lactamines et des céphalosporines sont inefficaces). De plus, la croissance retardée de ces germes rend souvent délicate l'interprétation de l'antibiogramme par diffusion des disques d'antibiotiques en milieu gélose. La sulfadiazine et les sulfamides ont longtemps été considérés comme étant le traitement de choix. On préfère actuellement l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole qui donnerait 90 % de succès thérapeutiques. Des résultats ont également été obtenus avec l'amikacine, la minocycline, la sulfone mère. Parmi les molécules récentes céfotaxime, ceftriaxone et imipénème sont actives *in vitro*, mais on manque de données thérapeutiques (à noter, chez *Nocardia*, la présence d'une pénicillinase inhibée par l'acide clavulanique).

2. *Dermatophilus*

L'association pénicilline G-streptomycine est active, mais d'autres antibiotiques agissent du moins *in vitro* : chloramphénicol, tétracycline, érythromycine, mais pas la griséofulvine.

BIBLIOGRAPHIE

BROWN I.R., « Human actinomycosis, a study of 181 subjects », *Human Pathology*, 1973, **4**, 319-330.

CASIN I., ORTENBERG M., SANSON-LE PORS M.J., DENIS J.J., DENIS C., PEROL Y., « *Actinomyces israelii* : Méthodes d'isolement et d'identification : A propos de dix observations », *Path. Biol.*, 1984, **32**, 153-159.

CURRY W.A., « Human nocardiosis, a clinical review with selected case reports », *Arch. Intern. Med.*, 1980, **40**, 818-826.

HOOLICK G.E., « Nocardiosis », *Clin. Microbiol. Newslet.*, 1988, **10**, 105-109.

KILIAN M. « Rapid identification of *Actinomycetaceae* and related bacteria », *J. Clin. Microbiol.* 1978, **8**, 127-133.

NOSEDA A., SERRUYS E., DEPRE G., « Infections à *Nocardia* : problèmes diagnostiques et thérapeutiques », *Presse Méd.*, 1985, **14**, 2179-2182.

VEYSSIER P., « Actinomycoses-Nocardioses », *Encycl. Med. Chir. Paris ; Maladies infectieuses*. 1979, **8123**, A 10.

WAKSMAN S.A. *Thé Actinomycetes*, William and Wilkins Ed. Baltimore. 3 vol., 1959-1962.

A signaler : plusieurs articles sur *Nocardia* dans *J. Hyg. Camb.*, 1983, **91**, 367-427.

*

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INDEX

BIBLIOGRAPHIE GENERALE

- BALOWS A., HAUSLER W.J., HERRMANN K.L., ISSENBERG H.D., SHADOMY H.J., « Manual of Clinical Microbiology », (5th Ed), 1991, *American Society for Microbiology*, Washington D.C., 1384 p.
- BERTRAND A., « Traitement des maladies infectieuses », 1981, *Flanvnarion*, 424 p.
- BOTTONE E.J., « Unusual microorganisms ». 1983, *Dekker*, New-York, 126 p.
- CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGUES R., « Bactériologie Médicale : Techniques usuelles », 1987, *SIMEP*, 330p.
- COLLINS C.H., GRANGE J.M., « Isolation and identification of micro-organisms of medical and veterinary importance », 1985, *Académie Press*, 387 p.
- COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.-P., GOLDSTEIN P., « Bactéricidie », 1990, *Maloine*, Paris
- COURVALIN P., GOLDSTEIN P., PHILIPPON A., SIROT J., « L'antibiogramme ». 1985, *MPC Videom*, Bruxelles, 343 p.
- DUVAL J., SOUSSY C.J., « Antibiothérapie », 4e édition, *Masson*, 1990, 188 p.
- FLANDROIS J.R., CHOMARAT M., « Bactériologie Médicale Pratique », 1988, *MEDSI/McGraw-Hill*, Paris 295 p.
- GIROUD J.P., MATHE G., MEYNIEL G. *et al.* « Pharmacologie Clinique, bases de la thérapeutique », 1989, *Expansion Scientifique Française*, Paris.
- KRIEG N.R., HOLT J.G., « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », vol 1., 1984, *Williams Wilkins*, Baltimore, 964 p.
- LECLERC H., IZARD D., HUSSON M.O., WATTRE P., JAKUBCZAK E., « Microbiologie générale », 1986, *Douin*, 370 p.
- LE MINOR L., VERON M., « Bactériologie Médicale », 1989, *Flanunarion*, 1107 p.
- MANDELL G.L., DOUGLAS R.G., BENNETT J.E., « Principles and practice of infections diseases », (3rd Ed), 1989, *Churchill Livingstone*, New-York, 2340 p.
- MARCHAL N., BOURDON J.L., RICHARD C., « Les milieux de culture », 1982, *Douin*.
- MICHEL-BRIAND Y., « Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques ». 1986, *Masson*, 370 p.
- SCHAETCHTER M., MEDOFF G., SCHLESSINGER D., « Mechanisms of microbial disease », 1989, *William Wilkins*, Baltimore, 844 p.
- SNEATH P.H.A., MAIR N.S., SHARPE M.E., HOLT J.G., « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », vol 2, 1986, *Williams Wilkins*, Baltimore.
- STANLEY T.W., SHARPE M.E., HOLT J.G., « Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », vol. 4. 1989, *William Wilkins*, Baltimore.

ANNEXES

CIRCULAIRE N° 642 DU 19 NOVEMBRE 1986 RELATIVE A LA DÉCLARATION OBLIGATOIRE DES MALADIES TRANSMISSIBLES

Le décret n° 86-770 du 10 juin 1986 (JO du 14 juin 1986) fixe la nouvelle liste des maladies à déclaration obligatoire

Cette liste est très réduite par rapport à la liste fixée par le décret du 29 juin 1960. En effet, la liste précédente très hétérogène n'était plus adaptée à la situation actuelle

1 Les maladies fréquentes, peu graves, étaient sous-déclarées par les médecins. La déclaration obligatoire ne remplissait pas dans ce cas son rôle d'instrument de surveillance. Un nombre de maladies à déclarer beaucoup plus limité devrait permettre une meilleure déclaration par chaque médecin.

2 Certaines maladies inscrites sur la précédente liste ne justifiaient plus une surveillance épidémiologique particulière, des maladies nouvelles sont apparues qui nécessitent absolument une surveillance spécifique et complète.

3 D'autres instruments de surveillance existent. Certains ont été développés récemment, en particulier ceux qui privilégient une démarche de surveillance par sondage auprès des médecins praticiens et/ou des laboratoires de diagnostic.

Ces moyens sont déjà mis en place pour des maladies qui ne figurent plus sur la nouvelle liste.

En effet, la surveillance des maladies transmissibles dépend de plusieurs instruments : déclaration obligatoire, Centres nationaux de référence, réseaux de surveillance cliniques ou biologiques, en particulier. Certains sont exhaustifs, d'autres procèdent d'une démarche d'enquête par sondage ou limitée sur le plan géographique. La « mise sous surveillance » d'une maladie doit être justifiée

- soit par la nécessité d'intervention qu'exigent l'origine, le potentiel épidémique ou la gravité de la maladie,

- soit par la nécessité d'évaluation s'il s'agit d'une maladie qui fait l'objet d'un programme de lutte ou de prévention. Ainsi, parmi les maladies à surveiller, la déclaration obligatoire reste un instrument indispensable pour certaines maladies devant faire l'objet d'une surveillance exhaustive.

Cette surveillance est organisée par les services de l'État.

L'information fournie par les données de la surveillance doit être utile aux professionnels de santé.

La nouvelle liste se décompose en deux groupes de maladies

- maladies justiciables de mesures exceptionnelles au niveau national ou international ce sont des maladies très rares, très graves, dont le diagnostic justifie l'expertise d'un Centre national de référence,

- maladies justiciables de mesures à prendre à l'échelon local et faisant l'objet d'une notification hebdomadaire au ministère chargé de la Santé ces maladies sont plus fréquentes, parfois indicatrices de la couverture vaccinale de la population.

Dorénavant, la déclaration obligatoire à l'échelon départemental est utilisée comme un instrument d'évaluation et de connaissance épidémiologique et non d'intervention. Elle ne doit donc plus être nominative. Elle sera faite après confirmation diagnostique et non des la suspicion comme auparavant.

Des instructions sur les modalités de la déclaration et de la codification des maladies seront prochainement publiées par voie réglementaire. De nouveaux formulaires de déclarations — enquêtes spécifiques à chaque maladie — y seront adjoints avec les critères de définition de la maladie, de façon à simplifier, à unifier la procédure et à éviter les sources d'erreur.

Pendant la période intermédiaire, il faut continuer à utiliser la numérotation en vigueur auparavant, pour chaque maladie qui demeure à déclaration obligatoire.

Pour les maladies qui ne figuraient pas sur la liste annexée au décret du 29 janvier 1960

- fièvres hémorragiques africaines,
- botulisme,
- SIDA,

elles doivent être mentionnées en toutes lettres.

Pendant cette période transitoire, les modalités de déclaration par les médecins praticiens restent également les mêmes qu'antérieurement.

Il est à noter que l'article L. 257 du Code de la santé publique concernant la déclaration obligatoire des maladies vénériennes est toujours en vigueur.

Les modifications prévues par le projet de loi particulière santé consécutivement à la décentralisation de la lutte contre les maladies vénériennes ne maintiendront pas la syphilis parmi les maladies sexuellement transmissibles à déclaration obligatoire.

Par ailleurs, indépendamment de la déclaration obligatoire et dans un but d'intervention, les D D A S S doivent inciter les médecins à leur notifier le plus

rapidement possible par un moyen approprié (téléphone, minitel, lettre) .

- toute maladie transmissible sévissant sous forme de cas groupés dans le temps ou l'espace, qu'elle soit ou non à déclaration obligatoire .

- les cas à expression clinique ou évolution inhabituelle ,

- toute maladie transmissible pour laquelle le médecin traitant juge nécessaire l'intervention des services de Santé publique (enquête épidémiologique, mesures préventives pour l'entourage, éviction, collectivité, etc)

Les indications de cette demande d'intervention de ta D D A S S doivent être posées par les médecins

praticiens eux-mêmes Chaque médecin des actions sanitaires doit s'efforcer de faire connaître ses capacités d'intervention et démontrer leur utilité Une communication interactive et efficace devrait concourir à améliorer les relations de vos services avec les médecins praticiens et à mettre en place un système épidémiologique efficace

Vous voudrez bien me faire part des difficultés rencontrées dans l'application de ces nouvelles dispositions et des suggestions que vous pourriez émettre pour les modalités de déclaration et d'enquête.

Pour le Ministre et par délégation
La directeur général de la Santé,
Professeur Jean-François GIRARD

CIRCULAIRE DGS/PGE/1 C N° 68 DU 18 JANVIER 1988 RELATIVE A LA DÉCLARATION OBLIGATOIRE DES MALADIES TRANSMISSIBLES

Pour faire de la déclaration obligatoire de certaines maladies un instrument fiable de surveillance épidémiologique, une rénovation des modalités de déclaration est actuellement en cours La circulaire n° 642 du 19 novembre 1986 a déjà précisé les nouveaux objectifs de cette déclaration

La liste des maladies a été récemment complétée et de nouvelles fiches de recueil d'informations sont désormais disponibles.

1. Liste des maladies à déclaration obligatoire

Le décret n° 87-1012 du 11 décembre 1987 modifiant le décret n° 86-770 du 10 juin 1986 ajoute deux maladies à la liste des maladies à déclaration obligatoire • la légionellose et, uniquement pour les départements d'outre-mer, le paludisme d'importation

La déclaration des légionelloses permettra de mieux surveiller les contaminations humaines par les systèmes de climatisation ou les tours de refroidissement, pour lesquelles il existe des mesures efficaces d'intervention

En ce qui concerne le paludisme, la situation est particulière dans les départements d'outre-mer En effet, aux Antilles et surtout à la Réunion où le paludisme est officiellement éradiqué, la présence permanente d'anophèles, vecteurs de cette maladie, constitue un risque de réintroduction du paludisme autochtone à partir des cas importés Seule une connaissance très précise des cas est capable d'orienter les actions à mener.

2. Modalités de la déclaration

Les modalités de la déclaration obligatoire sont actuellement réglementées par le décret du 21 décembre 1936 , un nouveau décret en préparation simplifiera ces procédures avec notamment une déclaration en un seul temps

La liste des maladies à déclaration obligatoire se décompose en deux parties

- la première regroupe les maladies justiciables de mesures nationales ou internationales Ces maladies doivent faire l'objet d'une déclaration téléphonique par les praticiens dans les meilleurs délais et obligatoirement d'une confirmation par le centre national de référence concerné (la liste de ces centres est précisée dans l'arrêté du 15 juin 1987) La Direction générale de la Santé doit être informée rapidement (téléx, téléphone, réseau télématique) de ces cas :

la deuxième partie de la liste regroupe les maladies qui sont justifiables de mesures à prendre à l'échelon local ou pour lesquelles la déclaration est un instrument d'évaluation Pour certaines de ces maladies, existaient des fiches d'enquêtes épidémiologiques qui n'étaient pas toujours adaptées à la situation actuelle . Afin d'améliorer la qualité des données provenant des déclarations, de nouveaux formulaires (ann. 1) devront désormais être utilisés

En tête de chacune de ces fiches, une zone est réservée pour que chaque D D A S S puisse y inscrire ses propres coordonnées (adresse, numéro de téléphone, nom de la personne à contacter) La surveillance épidémiologique étant de la compétence de l'État, toutes les fiches doivent être adressées à la D D A S S. En ce qui concerne la tuberculose, les D.D.A.S.S. devront veiller à ce que des copies des déclarations soient transmises de façon hebdomadaire aux services départementaux de lutte contre la tuberculose. L'intervention de ces services peut être demandée par le médecin déclarant pour un dépistage dans l'entourage ; vous veillerez donc à préciser sur la fiche « Tuberculose » le numéro de téléphone de ce service.

La déclaration d'un cas est enregistrée dans le département du lieu de domicile du malade

La validation des déclarations doit être faite au niveau départemental ; chaque D D A.S.S doit s'assurer :

1° Du respect des critères de déclaration (précisées en haut de chaque fiche) ;

2° De l'exhaustivité des informations demandées.

Chaque semaine, tous les formulaires de déclaration sont adressés au bureau des maladies transmissibles à la Direction générale de la Santé (1, place Fontenoy, 75700 Paris). Aucun autre organisme n'est actuellement habilité à recevoir ces informations

3. Intervention de la D.D.A.S.S.

Les médecins chargés des actions sanitaires sont amenés à intervenir, soit pour prendre des mesures préventives autour d'un cas (méningite à méningocoque, par exemple), soit pour effectuer une enquête épidémiologique (toxi-infection alimentaire collective ou autres cas groupes de maladies transmissibles)

Exemple d'un nouveau questionnaire de déclaration

MALADIE DECLARATON OBLIGATOIRE (Décret 10/6/1986)
modifié

LEGIONELLOSE

Direction Générale de la Santé

CRITERES DE DECLARATION

Pneumonie associée à l'isolement de Legionella dans les sécrétions respiratoires ou à une élévation (x4) des anticorps sériques contre Legionella.

* CHARACTERISTIQUES DU MALADE :	
- Initiale du nom : _____	- Prénoms : _____
- Sexe : M / F	
- Date de naissance : ____/____/____	Age : _____
- Code postal du domicile du patient : _____	
- Profession : _____	
- Date des premiers signes cliniques : ____/____/____	
* COMPOSITION DU SÉRUM/CRU : Isolation de Legionella NON OUI sérotype : _____	
Sérologie : _____ antigroupe : _____	
* FACTEURS PRÉDISPOSANTS :	
- Corticothérapie ou immunosuppresseurs : _____	OUI NON INCONNU
- Hépatite ou cancer : _____	OUI NON INCONNU
- Autre : _____	OUI NON INCONNU
* ORIGINE DE LA CONTAMINATION :	
Tendrait-on à croire qu'avant les premiers signes, le malade a-t-il séjourné :	
- dans un hôpital : _____	OUI NON INCONNU
- dans un hôtel : _____	OUI NON INCONNU
- dans un autre lieu : _____	OUI NON INCONNU
L'origine de la contamination a-t-elle été déterminée ou suspectée : _____	
* NOTION DE CAS CLASSE : OUI NON INCONNU	
Préciser : _____	
* ÉVALUATION : Oubliée, Oublie	

MEDECIN DECLARANT

Nom :

Adresse :

Téléphone :

Date de la déclaration :

Signature :

MALADIES

A DÉCLARATION OBLIGATOIRE

A Maladies justiciables de mesures exceptionnelles au niveau national ou International : choiera, peste, variole, fièvre jaune, rage, typhus exanthématique, fièvres hémorragiques africaines

B. Maladies justiciables de mesures à prendre à l'échelon mondial : fièvre typhoïde et paratyphoïde, tuberculose, tétanos, poliomyélite antérieure aiguë, diphtérie, méningite cérébrospinale à méningocoque et méningococ- cémies, toxi-infections alimentaires collectives, botulisme, paludisme autochtone, SIDA avéré, brucellose, paludisme d'importation dans les départements d'outre-mer, légionelloses.

LISTE DES CENTRES NATIONAUX DE RÉFÉRENCE POUR LA LUTTE CONTRE LES MALADIES TRANSMISSIBLES

(Arrêté du 22 janvier 1990)

I. CENTRES NATIONAUX DE RÉFÉRENCE DE L'INSTITUT PASTEUR

INSTITUT PASTEUR DE PARIS

28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 16, Tél : 45 68 80 00

Arbovirus

Laboratoire des Arbovirus

M. le Dr A. Chippaux
M. le Dr M.-V. Deubel

Bactéries anaérobies

Unité des anaérobies

M^{le} le Pr M. Sebald
M. le Dr M.-R. Popoff

Résistance aux antibiotiques

Unité des agents antibactériens

M. le Dr P. Courvalin

Fièvres hémorragiques virales

M. le Dr P. Rollin

M. le Dr J.-C. Saluzzo

Grippe (France-Nord)

Unité d'écologie virale

M. le Dr C. Hannoun

Leptospires

Laboratoire des leptospires

M. le Dr G. Baranton

M^{lle} le Dr Postic

Lysotypie et typage moléculaire de *Listeria*

Laboratoire des *Listeria*

M^{le} le Dr J. Recourt

Typage moléculaire des entérobactéries

Unité des entérobactéries

M. le Dr P.A.D. Gnmont
M^{le} F. Gnmont

Méningocoques et *Neisseria* apparentées

Unité d'écologie bactérienne

Laboratoire des *neisseria*
M. le Dr J.-Y. Riou

Mycobactéries

Unité de la tuberculose et des mycobactéries

M. le Dr H. David

Mm. y Levy-Febraut

Mycoses humaines et antifonguif

Unité de mycologie

M. le Dr B. Oupont

M. P. Boiron

Peste et autres yersiniose, tularémie

et pasteurelloses

Unité d'écologie bactérienne

M. le Dr H. Motlaret

M^{le} le Dr E. Cornwl

Rage

Unité de la rage

M. le Dr Sureau

M. le Dr H. Bourhy

Salmonella et *shigella*

Unités des entérobactéries

M. le Dr P.A.D. Grimont

M. P. Bouvet

Staphylocoques

Laboratoire des staphylocoques et des streptocoques

M^{le} N. El Soin

Vibrions et choléra

Unité du choléra et des vibrions

M. le Dr A. Dodin

M. le Dr J.-M. Fournier

Virologie et immunologie des retrovirus

humains (SIDA)

Unité d'écologie virale

M. le Dr L. Montagnier

M^{le} S. Chamaret

INSTITUT PASTEUR DE GUYANE

B.P. 304 - 97306 Cayenne Cedex

Chimiorésistance du paludisme

M. le Dr J.-P. Moreau

Fièvre jaune, dengue et grippe

M. 16 Dr J.-P. Moreau

II. AUTRES CENTRES NATIONAUX DE RÉFÉRENCE

Bruceella

Institut Bouisson-Bertrand (Montpellier)

Rue de la Croix-Verte - ZOLAD. route de Gangos

34090 Montpellier

Tél. - 67 54 45 77

M. le Dr J. Roux

M^{le} le Dr C. Arnaud

Chlamydia

Laboratoire de bactériologie et d'immunologie

générale faculté de médecine (Amiens)

Place Victor-Pauchet, B.P. 3006

80030 Amiens Cedex

Tél. - 22 44 25 25. poste 39-56

M^{le} le Dr J. Orfila

Entérovirus et hépatite virale A

Département d'épidémiologie virale

Laboratoire national de la Santé (Lyon)

8, avenue Rockefeller

69373 Lyon Cedex 08

Tél. - 78 77 70 31 poste 45-89

M^{le} le Dr M. Aymard

Grippe (France-Sud)

Département d'épidémiologie virale

Laboratoire national de la Santé (Lyon)

8, avenue Rockefeller

69373 Lyon Cedex 08

Tél. : 78 77 70 28

M^{le} le Dr M. Aymard

Haemophilus influenzae

Laboratoire central de microbiologie

C.H.U. de Toulouse (Purpan)

Place Docteur-Baylac

31059 Toulouse Cedex

Tél. • 61 77 23 57 et 61 77 21 22

M. le Dr H. Dabemat

M^{le} le Dr M.-B. Lareng

Hépatites virales B et non A non B

Institut national de transfusion sanguine (Paris)

6, rue Alexandre-Cabanel

75739 Paris Cedex 15

Tél. • 43 06 70 00

M^{le} le Dr A.-M. Courrouce

Légionnelles

Département d'épidémiologie bactérienne

Laboratoire national de la Santé (Lyon)

Rue Guillaume-Paradin

69372 LYON Cedex 08

Tel. 78 75 08 22

M. le Dr J. Fleurette

Listeria

Laboratoire de bactériologie

Faculté de médecine (Nantes)

Hôtel-Dieu, place Alexis-Ricordeau

44035 Nantes Cedex

Tél. 40 48 30 69

M. le Dr A.-L. Courtieu

Maladies d'importation

Institut Santé et Développement

15-21, rue de l'École-de-Médecine

75270 Paris Cedex 06

Tél. : 43 26 72 28

M^{le} le Dr M. Gentilini

Maladies sexuellement transmissibles:

Institut Alfred Fournier (Paris)

25, boulevard Saint-Jacques

75680 Paris Cedex 14

Tél. : 45 65 27 77

M. le Dr F. Catalan

Chimiorésistance du paludisme

Hôpital Bichat-Claude Bernard

46, rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18

Tél. : 40 25 88 99

M. le Dr J.-P. Coulaud

M. le Dr J. Le Bras

Sérologie du paludisme

Département de parasitologie. myco

et moléculaire

Université Joseph Fourier

(Grenoble 1)

Domaine de la Merci

38706 La Tronche Cedex

Tél. : 76 42 81 21. poste 42-72

M. le Dr Ambroise-Thomas

Pneumocoques

Service de microbiologie

du centre hospitalier

intercommunal (Créteil)

40, avenue de Verdun

94010 Créteil Cedex

Tel. 48 98 77 96

M. le Dr P. Geslin

Rickettieses

Unités des rickettieses groupe hospitalier

de La Timone (Marseille)

27, boulevard Jean-Moulin

13385 Marseille Cedex 05

Tel. : 91 92 13 11

M. le Dr O. Raoult

Surveillance épidémiologique du SIDA

Institut Léon M'Ba

Hôpital Claude Bernard (Pans).

10, avenue de la Porte-d'Aubervilliers

75944 Paris Cedex 19

Tel. : 40 36 37 51

M. le Dr J.-P. Coulaud

Staphylocoques

Département d'épidémiologie bactérienne

Laboratoire national de la Santé (Lyon)

Rue Guillaume Paradin

69372 Lyon Cedex 08

Tél. : 78 75 08 22

M. le Dr J. Fleurette

Surveillance de la tuberculose et des infections

à mycobactéries atypiques

Faculté de médecine

La Pitié-Salpêtrière

91, boulevard de l'Hôpital

75634 Paris Cedex 13

Tél. : 40 77 97 46

M. le Dr J. Grosset

Tréponèmes

Institut Alfred-Fournier

25, boulevard Saint-Jacques

75680 Paris Cedex 14

Tél. : 45 81 54 79

M^{le} le Dr A. Pans-Hamelin

Vaccinations de l'enfant

Centre international de l'enfance (Pans)

Château de Longchamp - Bois de Boulogne

75016 Paris

Tél. - 45 20 79 92. poste 122

M^{le} le Dr N. Guenn

Contrôle des vaccins

Laboratoire national de la Santé (Pans)

25, boulevard Saint-Jacques

75680 Paris Cedex 14

Tél. - 45 65 26 62

M^{le} le Dr Engaud

Surveillance des maladies transmissibles dans

les armées

Direction centrale du service de la santé des armées

Sous-direction Action scientifique et technique

(section épidémiologique)

14, rue Saint-Dominique

00459 Armées

Tél. 45 55 30 11 (poste 47-74)

M. le médecin chef des services Barabé

INDEX

A

Achromobacter : 284
Acido-alcool-résistance : 390,401
Acides teichoïques : 18,40
Acinetobacter : 67, **102**
 A. baumannii : 103, 105
 A. calcoaceticus : 102, 105
Actinobacillus actinomycetemcomitans : 255, 260
Actinomadura : 490, 496
Actinomyces pyogenes : 109, 121
Actinomyces : 327, **490**
Actinomycètes : **490**
Actinomycose : 492
Adénite mésentérique : **198**
Adhésion : 34, 154, 244
Aerococcus : 53
Aeromonas : 205, **218**, 224, 227
Afiptafelis : 240
Agglutination (réaction d') : 175, 203, 301
Agrobacterium : 286
Alcaligenes : 284
Aikalescens dispar : 156
Aminosides : 27, 49, 51
Anaérobiose : 325
Anatoxine : 120, 367
Angine de Vincent : 380
Antigènes O, H, Vi : 150, 170.212
Antistreptodomases : 47, 48
Antistreptokinases : 47, 48
Antistreptolysines : 47, 48
Anton (test d') : 127
Arachnia : 327, 490, 495
Arcanobacterium haemolyticum : 109, **120**

Arizonae : 166
Ascoli (réaction d') : 143
Avortement : 297

B

Bacillus : **135**
 B. anthracis : **137**, 143
 B. cereus : 142, 143, **144**
 B. Ucheniformis : 146
 B. megaterium : 146
 B. subtilis : 146
 B. thuringensis : 142, 146
Bacteroides : 327, 371, 373
 B. fragilis : 373
 B. melaninogenicus : 373
Bêta-lactamase : 25, 75, 82, 101, 187, 203, 249, 275, 378, 382
Bifidobacterium : 327
Bordet-Gengou (bacille de) : 314
Bordetella : **314**
 B. pertussis : 314
 B. bronchiseptica : 318
Borrelia : 432, **452**
 B. burgdorferi : 452
Botulisme : 339, 504
Branhamella catarrhalis : 67, 93, 95, **100**
Brucella : **296**
 B. abortus : 296
 B. melitensis : 296
 B. suis : 296
Bumet (intradermo-réaction de) : 303

C

- Calymmatobacterium granulomatis* **261**
 CAMP test: 38, 123
Campylobacter : **289**
C. co/; : 290, 292
C. fetus : 290, 292
C. jejuni : 290, 292
C. (H) pylori : 293
Capnocytophaga : 239, 255, **256**
C. carnimorsus : 239
 Capsule : 57, 59, 139, 244
Cardiobacterium hominis : **254**, 255
 Charbon : 139
 Centres Nationaux de Référence : 505
Chlamydia : 463, 482
C. pneumoniae : 482
C. psittaci : 482
C. trachomatis : 482
Citrobacter : 166, 170, **183**
Clostridium : 327, **334**
C. botulinum : 336, **338**
C. difficile : **336**, **349**
C. perfringens : 336, **354**
C. septicum : 336
C. sordellii : 336
C. tetani : 336, 361
 Coagulases : 17
 Colicines : 173
 Conversion lysogénique : 42, 115
 Coqueluche : 314
Corynebacterium : **109**
C. diphtheriae : **110**, 114
C. jeikeium : 114, 121
C. pseudodiphtheriticum : 114, 120
Coxiella : 473, 479

D

- Dermatophilus* : 496
 Diarrhées : 13, 145, 152, 162, 168,
 198, 209, 226, 291, 349
 Diphtérie: 111
 Ducrey (Bacille de) : **250**

E

- Edwardsiella* : 149
 EF4:239
Ehrlichia : 473
Eikenella corrodens : 255, 258
 Elek (test d') : 116, 118
Ent plasmide : 155

- Enterobacter* : 184, 187
E. aerogenes : 187
E. cloacae : 188
Enterobacteriaceae : **149**
Enterococcus : **31**, 36, 39, 43, **44**, 51
E. faecalis : 36, 43, 44, 51
Enterococcus : **31**, 36, 39, 43, **44**, 51
E. faecalis : 36, 43, 44, 51
 Entérocolite : 13, 198
 Entérotoxines : 12, 16, 144, 154, 161,
 213, 228, 351, 358
 Epididymite : 70
 Epiglottite : 243
Erwinia : 149
 Erysipéloïde : 132
Erysipelothrix rhusiopathiae : **131**
Escherichia coli : **152**
E. hermannii : 156
E. fergusonii : 156
E. vulneris : 156
Eubacterium : 327
Ewingella : 149
 Exfoliatines : 16

F

- Facteurs X, V : 241, 245
 Fiessinger-Leroy-Reiter (syndrome de) : 484
 Fièvre de Malte : 296
 Fièvre puerpérale : 31, 36
 Fièvre Q : 479
 Fièvre typhoïde : 166, 168
Flavobacterium : 283
F. meningosepticum : 284
Francisella tularensis : 321
 FTA-ABS test : 438, 439
 Furoncle : 12
Fusobacterium : 327, 371, 379, **381**
F. nucleatum : **379**
F. necrophorum : **381**

G

- Gardnerella vaginalis* : 385, **386**
 Gangrènes gazeuses : 327, 355
 Gemella : 53
 Gonocoque : 68
 Granulome inguinal : 262

H

- Haemophilus* : **241**
H. aegyptius : 247, 248

H. aphrophilus : 247, 255
H. ducreyi : **250**
H. haemolyticus : 247
H. influenzae : **241**, 248
H. parainfluenzae : 247, 248
H. paraphrophilus : 247
H. segnis : 247
Hafnia : 170, 184, **190**
Hansen (bacille de) : 422
Helicobacter : 293
H. pylori : 293
Hémine : 245
Hémolysines : 14, 38, 125, 228, 270
Hippurate (hydrolyse de l') : 39

I

Immunoglobuline A protéase : 244

J

JK : 121
Jonesia : 123

K

Kauffmann-White (tableau de) : 172
Kingella kingae : 67, 108
Klebs-Loeffer (bacille de) : 110
Klebsiella : **185**
K. pneumoniae : 185
Kline (réaction de) : 437, 439
Koch (bacille de) : 390
Koch-Weeks (bacille de) : 243, 248
Koserella : 149

L

Lactobacillus : 128
Lactococcus : 33
Lancefield : 32
Leclercia : 149
Legionella : 305
L. pneumophila : 306
Lèpre : 423
Lépromine : 425
Leptospira : 432, 443
Leptospirose : 447
Leptotrichia : 371, 383
Leucocidines : 15
Leuconostoc : 53
Listeria : **122**
L. monocytogenes : **123**
Listériose : 124

Lyme (maladie de) : 452, 455
Lymphogranulomatose vénérienne : 483
Lysotypie : 19, 128, 139, 173, 202, 215, 275. 300

M

Maladies sexuellement transmissibles : 70, 251, 261, 433, 466, 484
Malassez et Vignal (bacille de) : **196**, **197**
Martin et Pettit (sérodiagnostic de) : 450
Mélioïdose : 277
Mélitine : 303
Mélitococcie : 296
Méningites : 36, 45, 56, 57, 76, 243
Méningococcémie : 77
Méningocoque : 76
Méthicilline (résistance à la) : **26**
Micrococcus : 9, 21
Mitsuda (réaction de) : 426
Mobiluncus : 385, 387
Moellerella : 149
Mollicutes : 464
Moraxella : 67, **95**
M. atlantae : 99
M. bovis : 97
M. lacunata : 96
M. non liquefaciens : 97
M. phenylpyruvica : 98
M. osloensis : 98
Morganella morgani : 192, 194
Morsure : 238, 253
Morve (bacille de la) : 277
Mycobactéries atypiques : **410**
Mycobacterium : 389
M. africanum : 390
M. avium : 411, 412, 418
M. bovis : 390, 407
M. chelonae : 413, 421
M. fortuitum : 411, 413, 419
M. gastri : 411, 418
M. goodii : 411, 418
M. haemophilum : 411
M. intracellulare : 411, 412
M. kansasii : **4n**, **412**, **4n**
M. leprae : 422
M. marinum : **411**, **412**, **417**
M. phlei : **411**
M. scrofulaceum : 411, 412, 418
M. smegmatis : 411
M. terrae : 411, 418

M. tuberculosis : **390**
M. ulcérons : 411, 418
M. xenopi : 411, 413, 418
Mycoplasma : 470
M. fermentons : 468
M. genitalium : 469
M. hominis : 469
M. orale : 464
M. pneumoniae : 465, 469
M. salivarium : 464

N

NAD : 245

Neisseria : **67**
N. cinerea : 92
N. flava : 92, 93
N. gonorrhoeae : **68, 93**
N. kochii : 74
N. lactamica : 92, 93
N. meningitidis : **76, 93**
N. mucosa : 92, 93
N. polysacchareae : 92,93
N. sicca : 92, 93

Nelson (test de) : 438, 439
 Nicolas-Favre (maladie de) : 484
Nocardia : 490, 496

O

0/129 (composé vibriostatique) : 205
Oerskovia : 109, 149,492
Oligella : 67, 99
 Optochine : 59
 Omithose : 483

P

Pasteurella : 233
P. aerogenes : 233, **236**
P. haemolytica : 233, 236
P. multocida : 233, 236
P. ureae : 233, 236
Pediococcus : 53
 PénicilUinase : 25, 75
 Peptidoglycane : 18
Peptococcus : 9, 327, 330
Peptostreptococcus : 327, 330, 385
 Peste : 197
 Pfeiffer (bacille de) : 241
Photobacterium : 205
 Pian : 433, 441
Plesiomonas : 205, 218, 224, 227, **230**
 Pneumocoque : 55

Pneumonie : 56, 57, 306, 465, 483
 Polysaccharides : 18, 40, 59, 64, 79
 Porphyrine (test) : 246
Porphyromonas : 376
Prevotella : 376, 385
Propionibacterium : 327
 Protéine A : 19
Proteus : 192
P. mirabilis : 170, 194
Providencia : 192, 194
Pseudomonas : **265**
P. acidovorans : 279
P. aeruginosa : **268, 270**
P. cepacia : 270,279
P. fluorescens : 270,278
P. mallei : 277
P. (X.) maltophilia : 270
P. paucimobilis : 279
P. pickettii : 279
P. pseudomallei : 277
P. putida : 270, 278
P. putrefaciens : 279
P. stutzeri : 270, 278
P. testosteroni : 279
 Psittacose : 483
 Pyocyanique (bacille) : 268

R

Réagines : 437, 439
 Reiter (Tréponème de) : 438
 Rhumatisme articulaire aigu : 34
Rickettsia : 473
Rhodococcus equi : 109, 120
Rochalimaea : 474
Rothia : 492
 Rouget (bacille du) : 131
Salmonella enterica : **166**
S. Paratyphi : 167
S. Typhi : 167
 Satellitisme : 246
 Scarlatine : 36
 Schick (réaction de) : 119
 Sérény (test de) : 162
Serratia : 184, **189**
S. marcescens : 190
Shigella : **160**
 SIDA : 168,410, 504
 SPHA : 439
Spirochetaceae : 431
Staphylococcus : 9
S. aureus : 10, 18, 20, 23
S. capitis : 10, 23
S. epidermidis : **10, 22, 24**

S. haemolyticus : 10, 23
S. hominis : 10, 23
S. hyicus : 23
S. lugdunensis : 10, 23
S. saprophyticus : 10, 22,24
S. schleiferi : 10, 23
S. warneri : 10, 23
S. xylosus : 10, 23
Stomatococcus : 21, 53
Streptobacillus moniliformis : 238
Streptococcus : **31**
S. adjacens : 44
S. agalactiae : 35,42, 45, 50
S. bovis : 43
S. defectius : 44

S. dysgalactiae : 43
S. equi : 43
S. equinus : 43
S. equisimilis : 43
S. milleri : 37, 44
S. mutus : 37, 44
S. morbillorum : 44
S. mutans : 37, 44
S. pneumoniae : 32, 55
S. pyogenes : 33,35,42,50
S. salivarius : 37, 44
S. sanguis : 37, 44
S. suis : 37
S. zooepidermicus : 43
Streptomyces : 490, 496
 Syndrome de choc toxique : 13, 16, 36
 Syphilis : 434

T

TEM (bêta-lactamase de type) : 75, 106, 249
 Tolérance aux antibiotiques : 27, 50
 Toxi-infections alimentaires : 13, 145, 340,355
 Toxinotypie : 345, 347
 TPHA : 438, 439
 Trachome : 484
Treponema : 432
T. carateum : 433, 441
T. pallidum : 433
T. pertenue : 433, 441
 Tuberculine : 330
 Tuberculose : 397
 Tularémie : 321
 Typhoïde (fièvre) : 166
 Typhus : 476

U

Ureaplasma : **463**, 470
U. urealyticum : 466, 469
 Urétrite : 70, 466, 484

V

Vaginites : 466, 484
 Vaginoses : 385
VDRL : 437, 439
 Veillon (Flore de) : 328
Veillonella : 327, 330, 385
Vibrio : 205
V. alginolyticus : 218, 222
V. cholerae : 207, 212
V. parahaemolyticus : 218, 221
V. vulnificus : 218, 223
 Vincent (angine de) : 379

W

Weil et Félix (réaction de) : 479
 Widal (sérodiagnostic de) : 175, 180
 Whitmore (bacille de) : 277
 Wright (sérodiagnostic de) : 301

X

Xanthomonas, 267, **286**
X. maltophilia : 270, 287

Y

Yersin (bacille de) : 196
Yersinia : **196**
Y. enterocolitica : 197
Y. frederiksenii : 202
Y. kristensenii : 202
Y. pestis : 197, 198
Y. pseudotuberculosis : 197

Z

ZiehI-Neelsen (coloration de) : 401



Aubin Imprimeur

LIGUGÉ, POITIERS