

2. Examen bactériologique des selles (Coproculture)

La coproculture est recommandée en cas de diarrhée persistante, d'intoxication alimentaire, de suspicion de maladie intestinale... La coproculture est envisagée en cas de diarrhée aiguë en cas de :

- Trois selles molles ou liquides par jour depuis plus d'une journée et moins de 15 jours ;
- Fièvre supérieure à 40°C ;
- Présence de glaire ou de sang dans les selles ;
- Douleurs abdominales ;
- Retour d'un pays où les diarrhées bactériennes sont fréquentes ;
- Diarrhées chez des patients hospitalisés (diarrhée nosocomiale due à *Clostridium difficile*) ;
- Toxi-infection alimentaire collective (TIAC)

En pratique de routine :

- Chez l'adulte on recherche : *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrio cholérique* à la demande.
- Chez l'enfant < à 2 ans on recherche : *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella* et *Vibrio cholerae* à la demande.

2.1.Examen direct

Il comporte deux étapes : un examen macroscopique et un examen microscopique.

➤ Examen macroscopique

Un examen macroscopique consiste à noter la consistance des selles (moulée, selle molle ou en bouse, selle liquide, selle semi liquide, selle dure), et leur couleur : brune, jaune ou ocre, verte, décolorée, rouge ou noir. Ainsi la présence de glaires, de pus ou de sang. La selle peut être:

- **Normale:** moulée, molle ou liquide.
- Elle peut être diarrhéique ou afécale avec glaires sanglantes (dysentériques) ou, incolore en eau de riz (cholérique).

➤ Examen microscopique

-**Observation des selles à l'état frais :** pour les selles liquides, on travaillera directement sur la selle. Pour les selles moulées, Elle se fait par étalement de la matière fécale avec une goutte d'eau physiologique sur une lame propre puis recouvrir d'une lamelle, on fait l'observation au microscope optique (x40), et on note la présence des leucocytes, des hématies, et des bactéries très mobiles. Il permet d'apprécier un déséquilibre de la flore. A l'état normal, on trouve environ 4/5 de bacilles et 1/5 de cocci et de rares levures. Un processus invasif est caractérisé par la présence d'hématies et de leucocytes.

- **Observation des selles après coloration au bleu de méthylène :** Cet examen permet d'apprécier la flore, de voir les leucocytes (recherche des polynucléaires) et les levures.

-**Observation des selles après coloration de Gram:** Cet examen est très important, permet d'évaluer le pourcentage de bactéries Gram⁺ et Gram⁻ (voir si la flore est équilibrée entre bactéries à Gram positif et à Gram négatif : environ 60 % de bactéries Gram⁻, et 40 % de bactéries Gram⁺, dans une selle normale) (**Fig.04**), de rechercher les aspects caractéristiques (Entérobactérie, *Vibrio*). Il permet aussi de rechercher les leucocytes qui en quantité supérieure à 5 par champ, sont le signe d'une diarrhée à germe invasif, de même que la présence d'hématies.

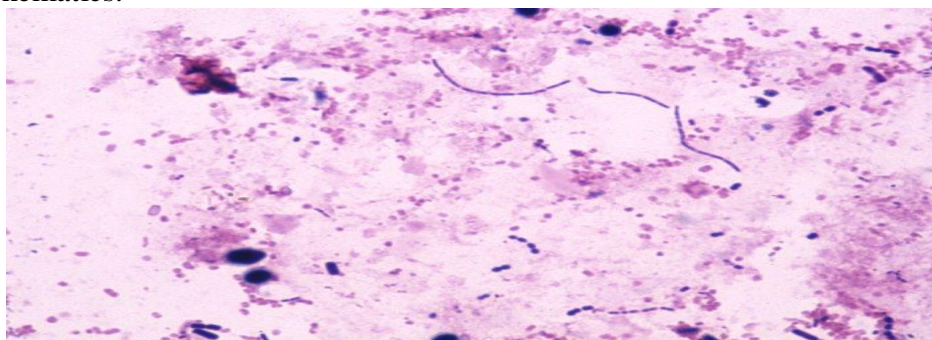


Figure 04 : Flore équilibrée : majorité de bactéries à Gram négatif.

2.2. Milieux utilisés et ensemencement

La recherche de certains germes responsables d'infections digestives peut être grandement facilitée par l'ensemencement dans des milieux sélectifs d'isolement et d'enrichissement, pour isoler, puis identifier l'agent infectieux. La culture s'effectue par l'ensemencement des milieux spécifiques suivants (**Fig.05**):

- Milieu Hektoen pour les bactéries entéro-pathogènes, particulièrement de *Salmonella* et de *Shigella*.
- Milieu Salmonelle-Shigelle (milieu SS).

Pour la recherche de *Salmonella*, on ensemence un milieu d'enrichissement au sélénite, milieu de Leifson, ou au tétrathionate, milieu de Muller-Kauffman, avec 0,5ml de selle. Il est important de les repiquer après 3 à 6 heures maximums d'incubation à 37°C. Il n'existe pas de milieu d'enrichissement pour *Shigella*.

➤ L'ensemencement et l'incubation

-Une dilution de la selle au 1/10 dans de l'eau distillée.

- L'ensemencement d'une goutte de la dilution en bouillon Mueller Kauffman (pour l'enrichissement en Salmonelle), et une goutte de la dilution en quadrant sur un milieu Hektoen, milieu SS.

-L'incubation de ces milieux se fait à 37°C pendant 18 à 24 heures.

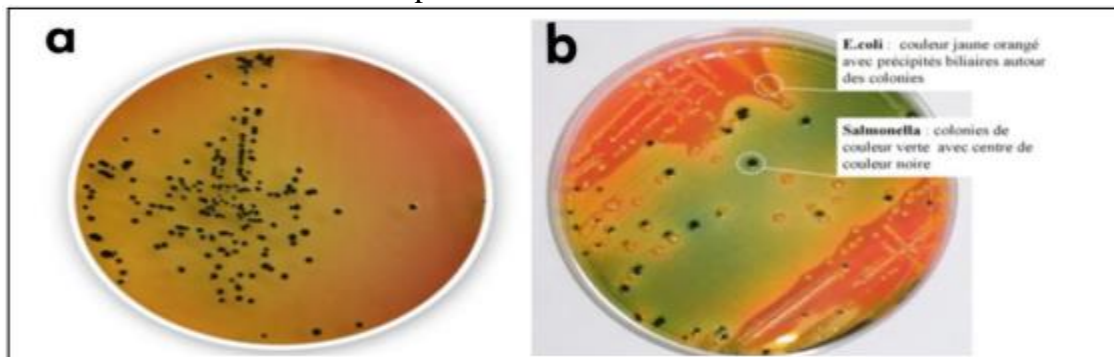


Figure 05 : a) milieu Salmonelle-Shigelle b) les germes *E. coli*, *Salmonella* sur milieu Hektoen.

2.3. Interprétation des résultats

➤ Résultat normaux d'une coproculture

Les résultats sont interprétés comme normaux lorsque la flore saprophyte ne présente pas de danger pour l'organisme. Une flore normale renferme plus de 400 espèces de bactéries différentes, on la considère normale quand elle est constituée de germes non pathogènes et en absence de globules blancs (leucocytes) ou de globules rouges (hématies).

➤ Résultat anormaux d'une coproculture

Les infections digestives et diarrhées aiguës sont dues principalement à la *Salmonella spp.* et des autres germes qui sont à une concentration très faible dans les selles : *Shigella*, *Campylobacter*, *Vibrio cholerae*, certains colibacilles : *Yersinia Enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* et *Clostridium*, et certains souches d'*Escherichia coli*.

3. Examen bactériologique du sang (Hémoculture)

Le sang est normalement stérile. Lorsque des agents infectieux passent dans le sang, de façon répétée, ils peuvent provoquer une infection grave. On parle de bactériémie, voire septicémie en cas de passages importants et répétés dans le sang des agents pathogènes.

L'hémoculture est un examen médical utilisé pour détecter la présence de bactéries ou de micro-organismes pathogènes dans le sang. C'est un outil diagnostique essentiel pour identifier les infections bactériennes systémiques, souvent appelées bactériémies ou septicémies. Les étapes d'hémoculture sont les suivantes :

3.1. Prélèvement et milieux d'hémoculture

Le milieu pour hémoculture est classiquement un bouillon conditionné en flacon sous pression réduite, et que l'on inocule avec le sang du patient à travers un opercule en caoutchouc. On trouve dans le commerce divers modèles de flacons d'hémoculture, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés. En incubation classique, diverses options sont proposées :

- La présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA (BIORAD) ou HEMOLINE (BIOMERIEUX) (Voir figure D).

- La présentation monophasique proposée par les mêmes fournisseurs et destinée à la détection des bactéries anaérobies strictes : il s'agit d'un bouillon de culture SCHAEGLER conditionné sous vide.

- L'hémoculture SIGNAL (OXOID) ; équipé d'un indicateur de croissance (Voir figure C).

- Le bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.



Fig. 11.1. – Flacons d'hémocultures retrouvés sur le marché.
 A) Gamme de flacons pour les Bactecs® (Becton Dickinson) ;
 B) Gamme de flacons pour le BACT/ALERT® (bioMérieux) ;
 C) flacon manuel Signal® (Oxoid) équipé de son indicateur de croissance ;
 D) Flacon manuel Hémoline® (bioMérieux) ;
 E) Système Isolator® (Oxoid)

Classiquement, tout bouillon pour hémoculture est un bouillon nutritif enrichi de facteurs de croissance : Peptones de Caséine et de Gélatine, Extraits de levure, NAD et Hémine, Vitamines B6, K3, Cystéine. L'atmosphère à l'intérieur du flacon est faite de CO₂. L'anticoagulant est le SPS (Sodium polyanéthole sulfonate).

➤ Nombre de flacons et volume de sang à prélever

Les prélèvements doivent être répétés afin de majorer les chances d'isolement de l'agent causal. Classiquement, on admet 2 à 3 hémocultures, c'est à dire 4 à 6 flacons (2 à 3 paires aérobies et anaérobies sur une période de 24 h). Pour le volume de sang à prélever, il doit être de 10 ml par flacon chez l'adulte, de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson.

➤ L'acheminement au laboratoire

Les flacons d'hémoculture sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse, de préférence enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme. Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire.

3.2. Incubation et suivi des flacons d'hémoculture

Une incubation à 37°C pendant 7 jours est recommandée pour les systèmes manuels. Les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6^{ème} heure d'incubation, à la recherche d'un signe de culture. La surveillance des flacons est visuelle, basée sur la recherche d'un trouble, d'un voile en surface, d'une hémolyse, d'un coagulum, de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne. En cas de flacon biphasique (CASTANEDA), l'apparition de colonies sur la paroi gélosée pose le diagnostic d'hémoculture positive (Tab. 01).

Tableau 01 : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité.

Aspect macroscopique	Bactérie en cause
Turbidité	<i>Bacilles à Gram – aérobies</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i>
Hémolyse	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>
Production de gaz	<i>Bactéries aero-anaérobies ou anaérobies strictes</i>
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonies au fond du flacon	<i>Streptococcus sp.</i> <i>Nocardia sp.</i>

3.3. Traitement des flacons positifs

Devant toute suspicion de positivité, un examen microscopique et une mise en culture sont réalisés sur les flacons. Les flacons d'hémoculture ne sont jamais ouverts ; l'isolement et l'identification des agents infectieux sont réalisés à partir d'un échantillon prélevé par ponction à la seringue, de chaque flacon. Toutes les manipulations se font sous hotte bactériologique à flux laminaire. Le port d'un masque et de gants est indispensable vu le risque de transmission au manipulateur, de certains germes dangereux (exemple *Brucella*).

➤ Examen microscopique

Sous un poste de sécurité microbiologique, le bouillon est prélevé de façon aseptique après avoir désinfecté l'opercule du flacon, et à l'aide d'une seringue. L'examen du bouillon est effectué en deux étapes :

- L'état frais afin d'observer la morphologie et la mobilité des bactéries.
- la coloration de Gram pour déterminer plus précisément la morphologie des bactéries (cocci ou bacille) et leur affinité tinctoriale (G⁺ ou G⁻). Pour certains germes, on peut avoir recours à d'autres colorations bleue de méthylène, acridine orange...etc). Tout résultat positif de l'examen direct doit être communiqué

rapidement au clinicien, notamment si plusieurs flacons sont positifs, s'il ya de *Clostridium* ou *Neisseria* ou si les patients sont à risque (immunodéprimés).

➤ **Inoculation (repiquage)**

Les repiquages de flacons suspects sont effectués en fonction de l'examen direct. Les cultures étant généralement monomicrobiennes, des milieux gélosés non sélectifs seront utilisés, gélose colombiana avec 5% de sang frais incubées en aérobiose pendant 48h et en anaérobiose pendant 5 jours, gélose au sang cuit enrichi (polyvitex) placés sous CO₂ pendant 48h lorsqu'un *Haemophilus spp.* ou *Neisseria spp.* sont évoqués.

Si à l'examen direct un mélange de bactéries est suspecté, des milieux sélectifs pourront être utilisés, la gélose ANC (Acide nalidixique- colistine) pour isoler sélectivement les bactéries à Gram⁺ et la gélose CLED (Cystine Lactose Electrolyte Déficiant = milieu enrichi en cystine et lactose et pauvre en ions) pour les bacilles Gram⁻. Le choix de l'atmosphère (aérobiose, CO₂ ou anaérobiose) pour l'incubation de ces milieux à 37°C dépend du diagnostic présumé (**Tab. 02**).

Les flacons sont conservés à température ambiante pour un éventuel nouveau repiquage ultérieur si les cultures sont restées négatives.

Tableau 02 : Milieux utilisés pour les repiquages d'hémocultures.

Agents recherchés	Repiquage sur milieux de culture suivants	T° et durée d'incubation
<i>Brucella sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : TSA+5% sérum de bœuf ou Brucella Agar)	37°C 48h -72h S Sous 5% CO ₂
<i>Campylobacter sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit (autres : milieu de Skirrow ou Butzler ou Karmali)	37°C 3- 4jrs 5% CO ₂ Microaérophilie
<i>Legionella sp</i>	BCYE	37°C 15jrs 5%CO ₂
HACCEK	Columbia au sang cuit Columbia au sang cuit +PVX	37°C 4jrs S/CO ₂
<i>Abiotrophia sp</i> <i>Granulicatella sp</i>	Columbia + sang frais+strie de Staph (Satellitisme) Autres : Columbia +sang frais+ 0,001% Pyridoxal Enrichissement sur TODD HEWITT + PVX	37°C 3jrs S/CO ₂
<i>Bartonella quintana</i> Ou <i>Bartonella henselae</i>	Prélèvement de sang sur tube hépariné Utilisation du système de centrifugation-lyse Culot de centrifugation mis en culture sur Columbia +sang frais de mouton ou de lapin Mise en culture sur lignée cellulaire (cellules endothéliales)	37°C 6 semaines 5% CO ₂ 37°C 10 jrs /CO ₂
Leptospires	Prélèvement de sang sur tube hépariné Milieu au Tween + Albumine en tubes	30°C à l'obscurité 2 mois
Mycobactéries	Hémoculture en Bact/alert- flacon d'hémoc. spécifique pour Mycobactéries	
Levures	Sabouraud	30°C 1 mois
Mycoplasmes Ureaplasma	Culture en bouillon PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) ou en gélose A3	37°C Microaérophilie 3 jours

➤ **Identification et antibiogramme**

Sur des hémocultures monomicrobienne, suivant le type bactérien observé à la coloration de Gram, une identification sera parallèlement lancée. Il est possible à partir d'un culot lavé, de réaliser directement un antibiogramme.

Dans le cas d'un mélange de bactéries suspecté à l'examen direct, les colonies des repiquages seront pratiqués avec quelques test biochimiques, permettant d'orienter vers une identification complète (galerie, biotypage/serogroupage...etc), et d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

3.4. Interprétation des résultats

➤ **Résultats normaux (négatifs)**

- Les différentes hémocultures sont stériles, aucun germe n'est retrouvé.
- Une hémoculture négative ne veut pas forcément dire qu'il n'existe pas d'infection, mais cela indique qu'à l'instant précis où le prélèvement a été pratiqué il n'y avait pas de germes dans le sang.
- Ou alors que le germe responsable de l'infection a des exigences de cultures très particulières et qu'il ne pousse pas dans les milieux de cultures usuels. Le résultat est alors faussement négatif.

➤ **Résultats anormaux (positifs)**

L'interprétation des résultats des hémocultures positives est simple quand il y'a un isolement d'une bactérie pathogène spécifique (BPS) : *Salmonella typhi*, *Brucella*, *Neisseria meningitidis*, par exemple. L'isolement de telles bactéries impose le diagnostic.