

BG P (bacilles à Gram positif) : *Listéria*, *Corynébactérie* et *Mycobactéries*

Cours de Microbiologie

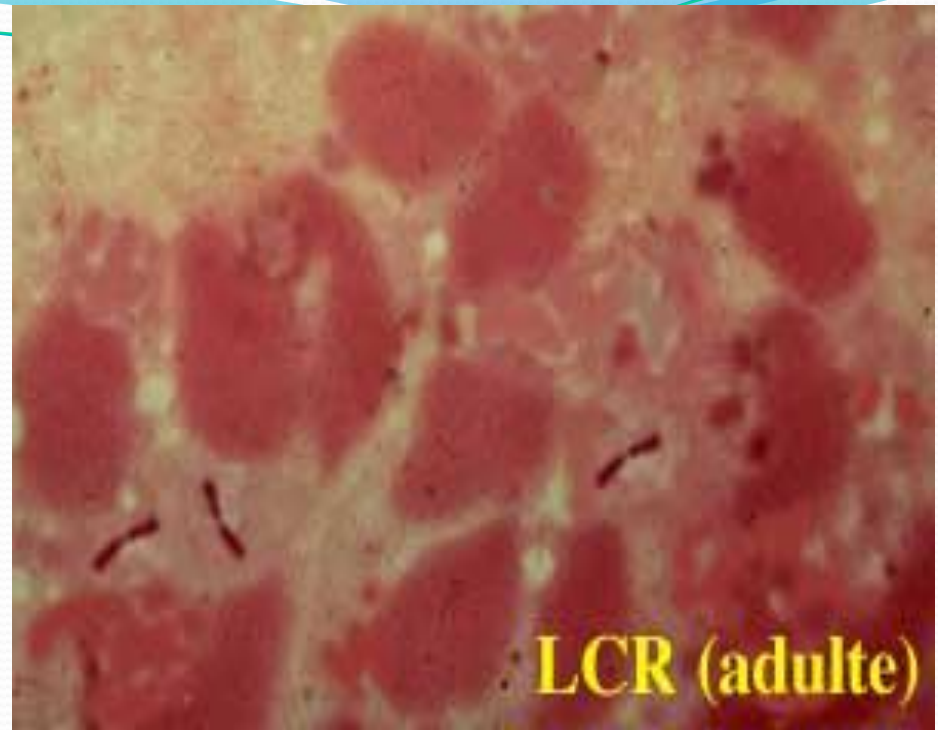
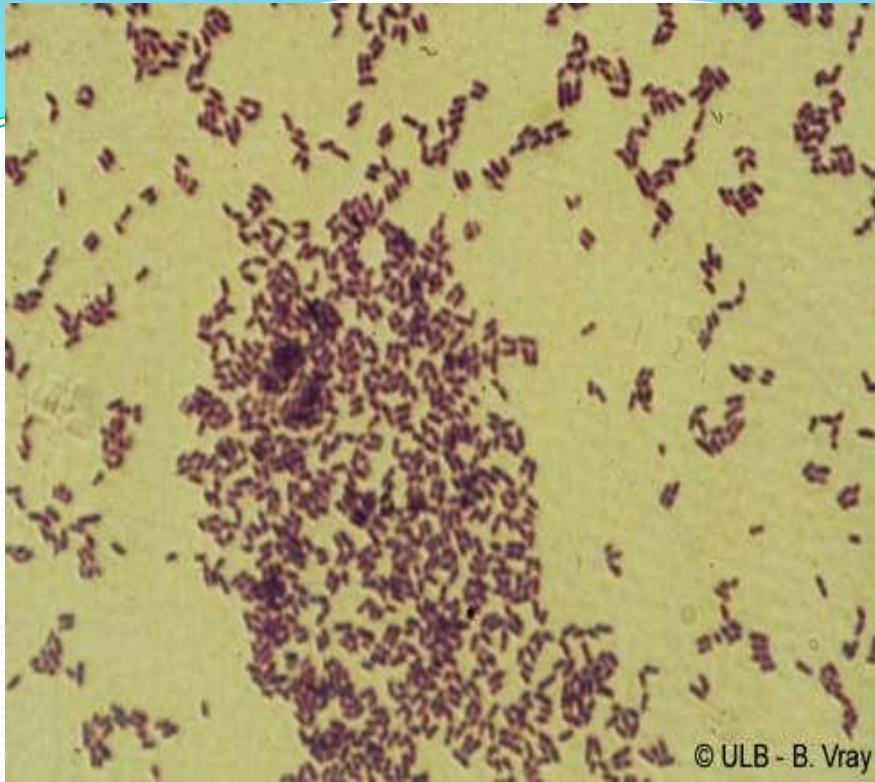
3^{ème} Année Médecine

Année universitaire 2020-2021.

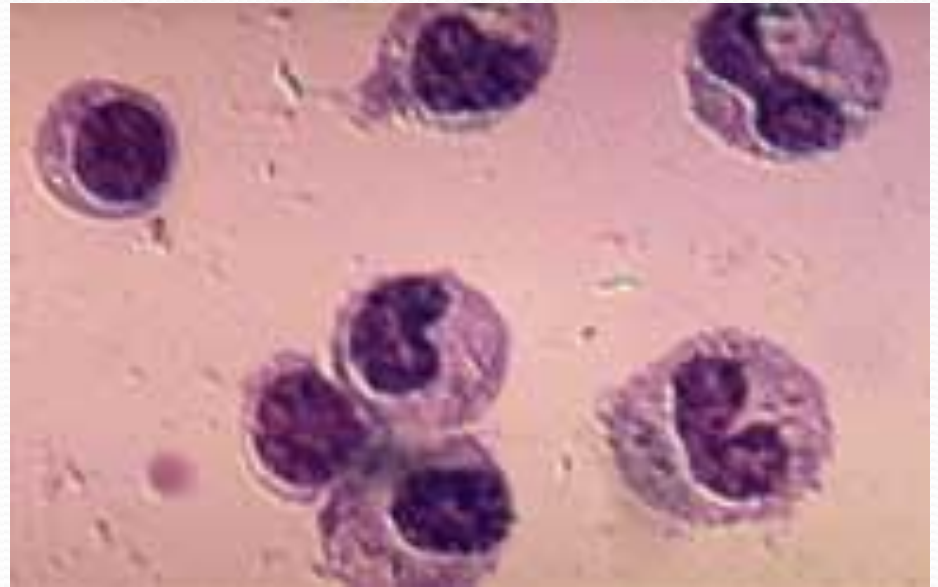
Pr S. BENAMMAR

MCA-HU en Microbiologie clinique

Faculté de Médecine -Batna



Listeria



GENERALITES

- ❖ Le genre *Listeria* comprend 5 espèces dont *Listeria monocytogenes*.
- ❖ ***L. monocytogenes* est une bactérie à Gram positif, commensal du tube digestif des animaux et saprophyte.**
- ❖ **Bactérie invasive => Infections sévères** chez l'homme et les animaux .
- ❖ **Infections graves chez les patients fragilisés :** femmes enceintes, nouveau-né, patients immunodéprimés,
- ❖ **Bactérie intracellulaire facultative:** capable de survivre et de croître à l'intérieur de la plupart des cellules de l'hôte infecté.

Epidémiologie/ Propriétés physico –chimiques

- Infection par : **l'alimentation.**
- **Aliments à risque** : charcuteries (pâté, rillettes,...) , certains: produits laitiers (fromages au lait cru ...), poissons fumés (saumon...) et végétaux (soupe de choux, soja...).
- Bactérie détruite par la chaleur : **30 min à 55°C, 1-2 min à 100°C.**
- Elle est **très sensible au pH acide** → pas de contamination des yaourts.
- **Peut survivre à +4 °C**

POUVOIR PATHOGENE

- Incubation : quelques heures à 8 semaines.
- La maladie débute par une **fièvre isolée** (forme bactériémique), sans diarrhée.
- **Sujet immunocompétent** → gastro-entérites avec diarrhée.
- **Patients fragiles : Septicémie d'origine digestive** avec risque **d'infection foeto-placentaire et de méningo-encéphalite.**
 - **L'infection materno-infantile:**
 - ❖ Chez la mère : infection inapparente ou Sd pseudo-grippal ,
 - ❖ Chez le nouveau né :
 1. Soit **détresse respiratoire** à la naissance. Mortalité élevée .
 2. Soit **méningite purulente (tardive)**. Meilleur pronostic

Diagnostic au laboratoire

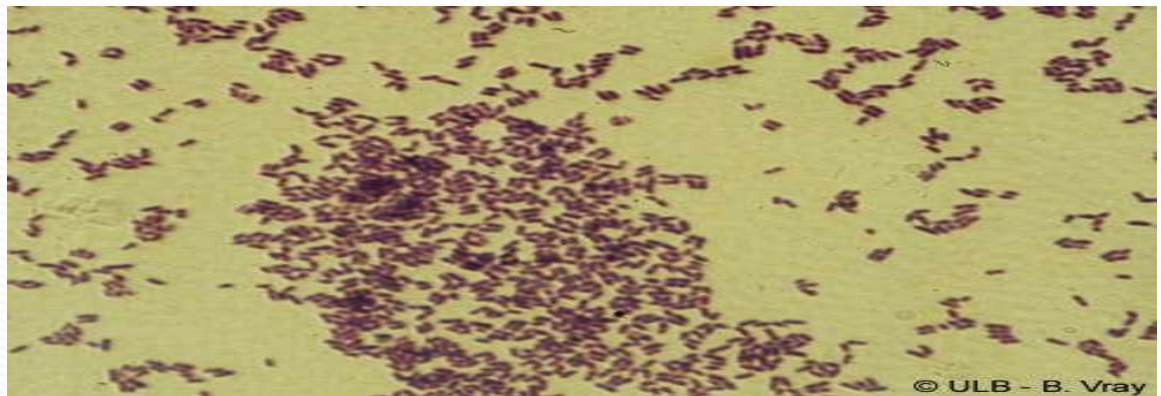
A. Diagnostic direct classique:

1. Prélèvements :

- **Hémoculture (HC) et liquide céphalo-spinal (LCS),**
- Chez le nouveau-né : **HC , LCS ,liquide gastrique ,méconium et peau.** Prélèvements de selles en cas de diarrhée ☐ **Transport rapide + fiche de renseignement correctement remplie.**

2. Examen direct : état frais et coloration de Gram :

Bacille à Gram positif, en courtes chaînettes ou petits amas ,non sporulé et intracellulaire , immobile à 37°C et mobile à 22°C.



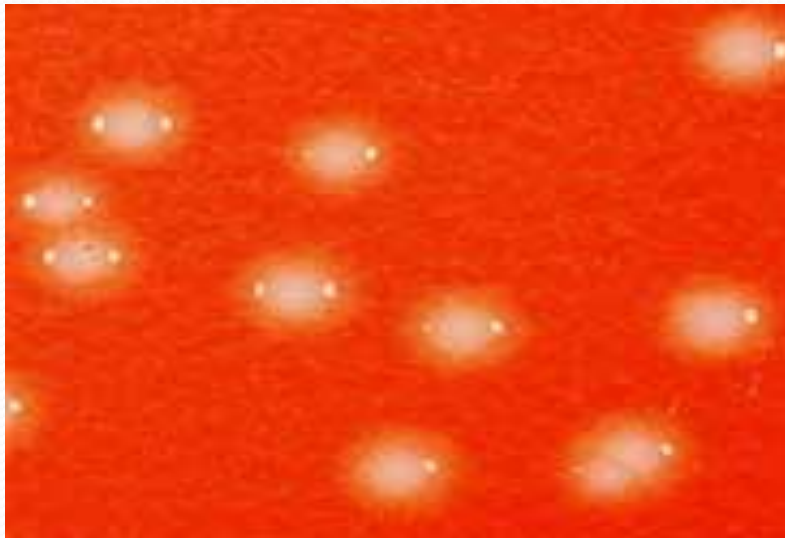
Diagnostic au laboratoire

3. Mise en culture du prélèvement :

Mise en culture sur **milieux ordinaires ou gélose au sang (GS)**, □
Incubation en atmosphère normale à **35-37° C, pendant 24h**

□ Les colonies sont petites (1-2 mm), transparentes, entourées d'une zone **d'hémolyse β** (sur GS),

Possibilité de croissance sur milieux hostiles : bile –esculine et milieu hypersalé.



Diagnostic au laboratoire

3. Identification :

1. Gram caractéristique, **mobilité différentielle en fonction de la température (immobile à 37°C et mobile à 22°C)**

2. **Capable de pousser à + 4°C.**

3. Identification précise par galerie Api-Listeria.

4. Antibiogramme et sensibilité aux antibiotiques :

Résistance naturelle aux céphalosporines de 3^{ème} génération et la fosfomycine.



B. Diagnostic moléculaire :

Recherche du génome viral de la bactérie par PCR.

Traitement /Prévention

● Le traitement de choix d'une listériose neuroméningée =

ampicilline-aminosides

□ **Prévention :**

1- Contrôle rigoureux des aliments industriels.

2- Education des groupes à risques et des consommateurs.



Corynébactérie

Classification

- ✓ **Famille:** *Corynebacteriaceae*
- ✓ **Genre:** *Corynebacterium*
- ✓ 88 espèces dont 53 d'intérêt médical.
- ✓ **Espèce type:** *Corynebacterium diphtheriae* (bacille de Klebs et Loeffler)
- ✓ **Autres espèces:**
 - *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*
 - *C. urealyticum*, *C. jeikeium* : opportunistes, pathogènes pour les sujets immunodéprimés.

Intérêt /Epidémiologie/Transmission

- ❖ Les corynébactéries du complexe *diphtheriae* : *C. diphtheriae*++, *C. ulcerans*, *C.pseudotuberculosis*, responsables de la Diphthérie sont **strictement humaines**.
- ❖ La diphtérie est une **toxi-infection** liée à une souche porteuse ou non du gène codant la toxine diphtérique.
- ❖ C'est une maladie à déclaration obligatoire.
- ❖ Elle est épidémique et contagieuse.
- ❖ Transmission :
 - ✓ **Directe** : gouttelettes provenant des voies aériennes supérieures.
 - ✓ **Indirecte (plus rare)** : par les objets souillés à partir d'un malade ou d'un porteur sain

Pouvoir pathogène

❑ Deux types de manifestations:

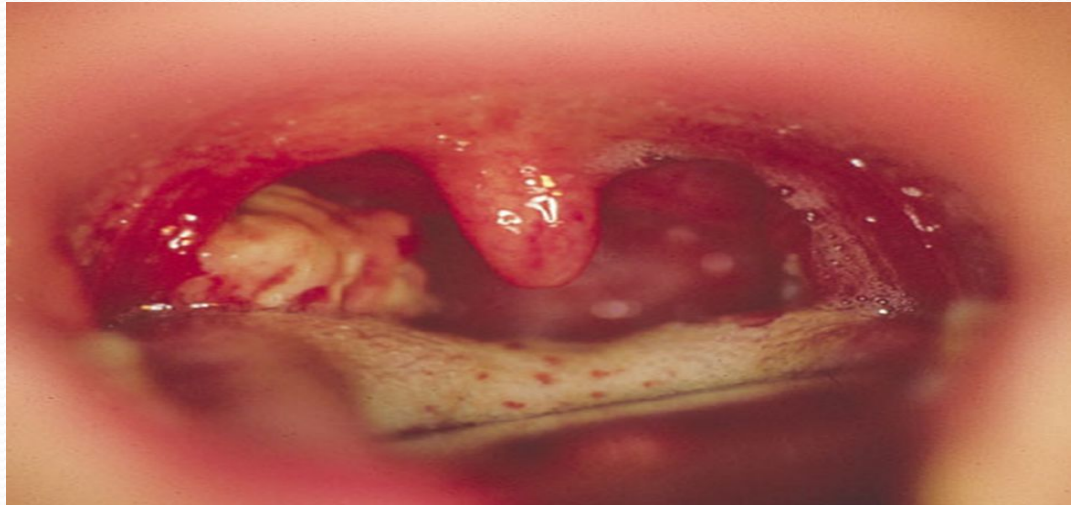
✓ **Locales:** liées à la multiplication de la bactérie au niveau de la porte d'entrée.

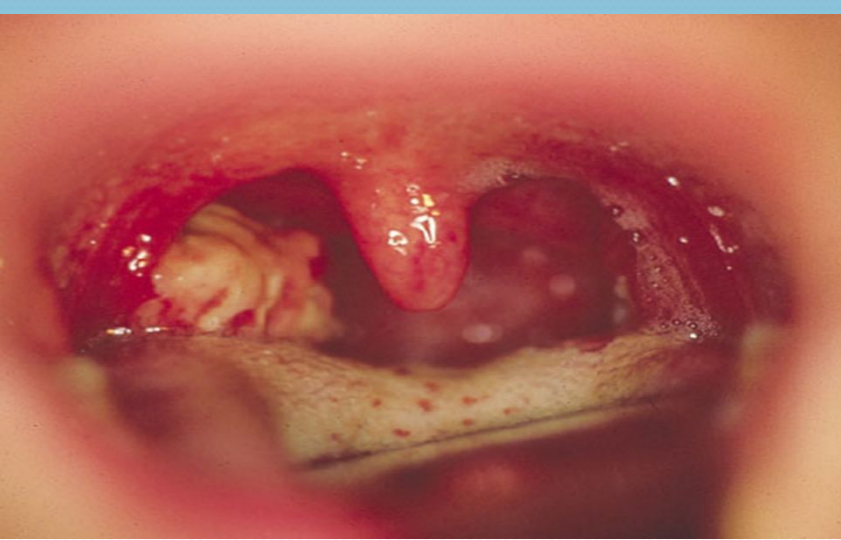
✓ **Générales:** liées à la toxinogénèse.

❑ **Forme typique : Angine pseudo-membraneuse:**

Fausses membranes extensives sur les amygdales et la luette avec adénopathies satellites parfois volumineuses (*bull neck*)

En absence de sérothérapie , cette forme évolue vers la forme maligne.





Signes d'intoxication (Forme maligne) = toxine pantrope:

- Signes neurologiques**
- Signes cardiaques**
- Signes digestifs**
- Signes rénaux**
- Syndrome
hémorragique**



Diagnostic bactériologique

- Le diagnostic de la diphtérie est avant tout clinique et doit entraîner en urgence un traitement spécifique.
- La suspicion clinique de diphtérie impose immédiatement un prélèvement de gorge => Transport rapide au laboratoire à température ambiante, pour un examen direct en urgence à la recherche de corynébactéries.
- Le diagnostic est une urgence pour le laboratoire de microbiologie à qui il est indispensable de fournir les renseignements épidémiologiques et cliniques.
- Il repose sur :
 - 1- L'isolement du *Corynebacterium diphtheriae*.
 - 2- La mise en évidence de la toxine diphtérique.
 - 3- Des tests de Biologie moléculaire

Diagnostic bactériologique

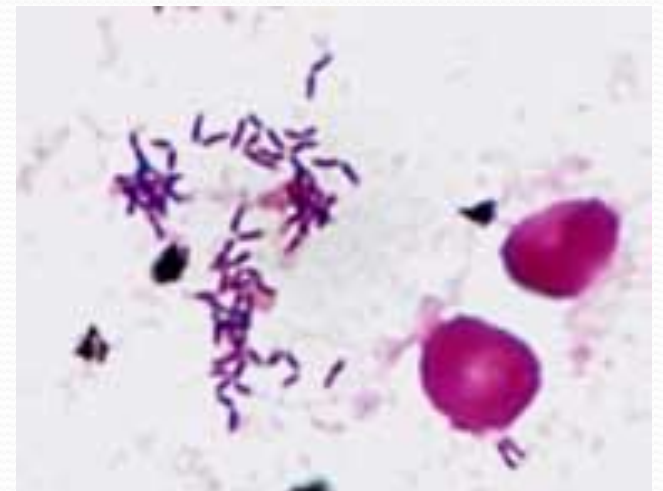
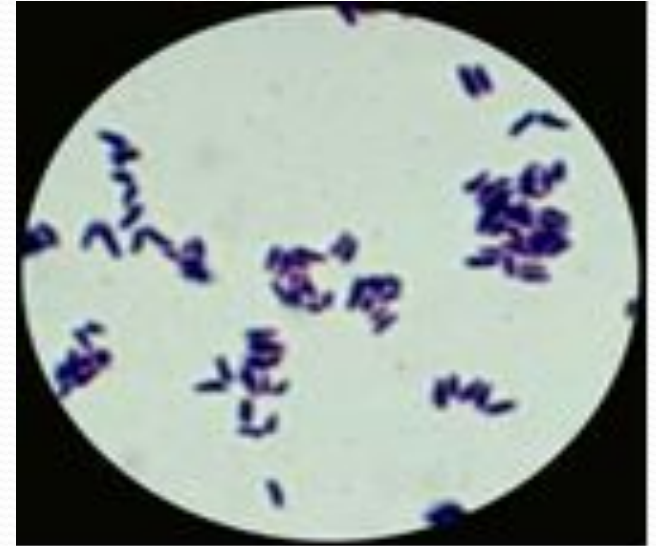
A. Isolement de la bactérie :

1. Prélevements :

- Gorge : fausse membrane et sa périphérie,

2. Examen direct:

Bacilles à Gram positif droits ou incurvés, avec des extrémités arrondies (en haltères), disposés en lettres d'alphabet, ou palissade, ou paquets d'épingles immobiles, non capsulés, non sporulés,



3. Mise en culture :

■ Bactérie exigeante → Milieux riches : sang ou sérum

a. Gélose au sang (GS).

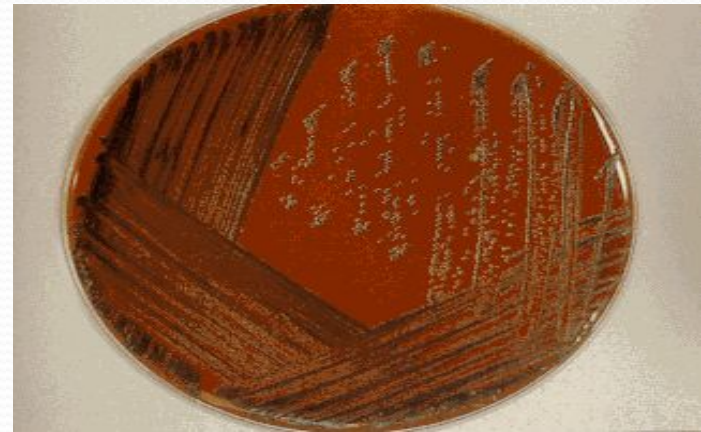
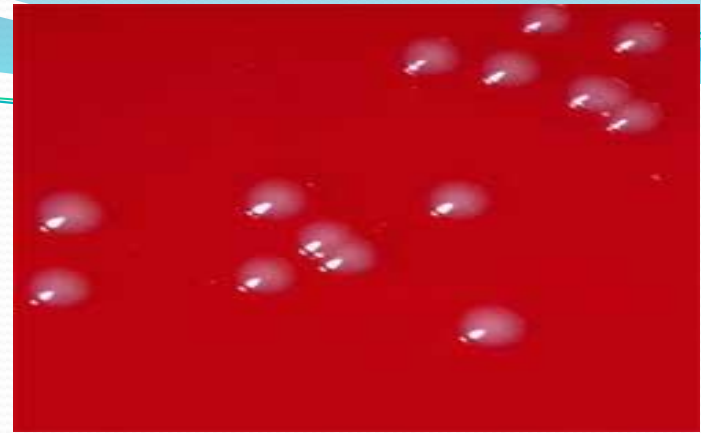
b. Milieu au sérum de bœuf coagulé = milieu de Loeffler

c. **Milieu de Tinsdale:**

Colonies noires , entourées d'un halo noir (En 24-48h),

4. L'identification :

Aspect au Gram , à la culture et
Galerie Api *Corynébactérie*



Diagnostic bactériologique

B. Recherche de la toxinogénèse :

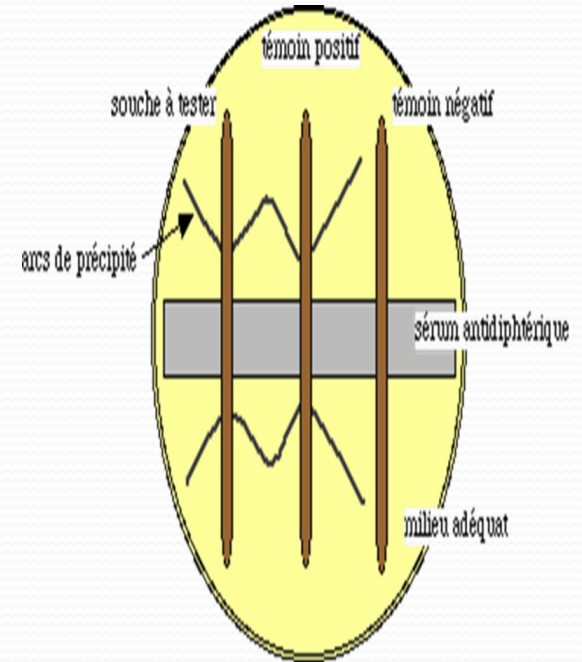
Après confirmation de l'identification, la recherche de la toxine est indispensable et doit être faite en urgence.

1. Réaction d'immunoprécipitation

sur gel ou « **test d'Elek** ».

2. PCR:

Détection du gène *tox* codant pour la toxine.



C. Biologie moléculaire:

Recherche par PCR à partir de cultures et des prélèvements,

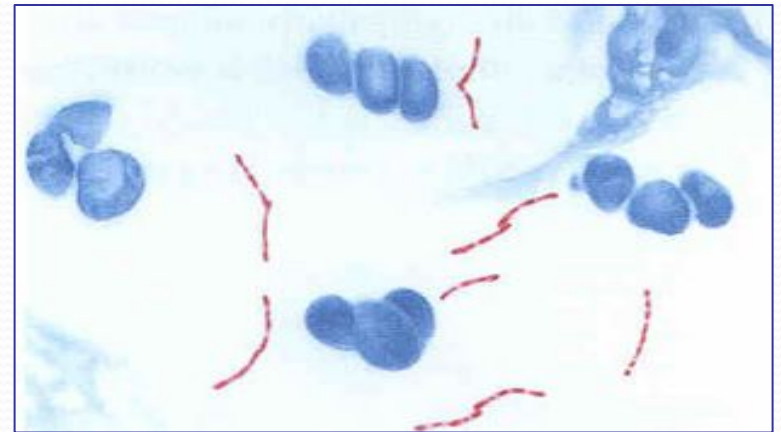
Traitement

A-Curatif :

- La diphtérie est une urgence médicale.
- **Sérothérapie précoce et rapide : sérum antitoxine diphtérique purifié** (de cheval +++, ou humain)
=> **neutraliser la toxine.**
- **Vaccination:** car l'immunisation par la maladie est faible et inconstante.
- **Antibiothérapie :** pénicillines, érythromycine.

B-Préventif :

- ◆ **Vaccination par l'anatoxine de Ramon: toxine inactivée par du formol 0,1%.**
- ◆ **Les sujets contacts reçoivent un rappel de vaccin+ Erythromycine.**



Mycobactéries

Classification

- Ordre : *Actinomycetales*
- Famille : *Mycobacteriaceae*
- Genre : *Mycobacterium*
- Espèces : plus de **90** espèces de mycobactéries.

Habitat / Pouvoir pathogène

- ❑ Réservoir de *M.tuberculosis* et de *M.leprae* = Humain
 - ❑ Réservoir des mycobactéries non tuberculeuses = environnement
 - ❑ Les Mycobactéries sont à l'origine de 3 types d'infections :
1. La tuberculose: 3 espèces du complexe *tuberculosis*:
M.tuberculosis, *M.bovis* et *M. africanum*
 2. La lèpre (*M.leprae*),
 3. Les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries commensales dites « atypiques » : *M.avium*, *M. kansasii*, *M. marinum*.....: surtout chez l'immunodéprimé

Transmission /Epidémiologie

❖ La transmission se fait par:

✓ **Voie aérienne:**

Par les gouttelettes de Flügge à l'occasion d'accès de toux ou d'éternuement.

✓ **Voie digestive:**

Ne concerne que la tuberculose à *M. bovis* . Contrôlée si le lait est pasteurisé.

❖ Tuberculose = une des maladies infectieuses les plus mortelles, d'évolution chronique.

❖ **Localisation pulmonaire: la plus fréquente et la plus contagieuse.**

Pouvoir pathogène *Complexe tuberculosis*

A. *M.tuberculosis* = bacille de Koch

Son réservoir est l'homme.

1. La primo-infection tuberculeuse:

✓ Généralement asymptomatique,

✓ Evolution : guérison ou tuberculose maladie.

2. La tuberculose pulmonaire .

3. Autres tuberculoses : ganglionnaire, rénale, génitale, osseuse, péricardique, péritonéale, et méningite tuberculeuse.

4. La miliaire tuberculeuse: dissémination massive du bacille dans tout l'organisme.

B. *M.bovis* :

Responsable de tuberculose bovine transmise à l'homme.

C. *M. africanum* :

Agent de tuberculose en Afrique centrale .

Sensibilité aux agents physiques et chimiques

A . Agents physiques:

- ✓ Sensibles à la chaleur et résistent à + 4°C.
- ✓ Sensibles aux rayons UV.
- ✓ Résistent à la dessiccation .

B . Agents chimiques:

- ✓ Sensible à de nombreux désinfectants : hypochlorite de sodium à 1 %, solution d'iode et d'alcool, glutaraldéhyde, formaldéhyde.
- ✓ Résistent aux ammoniums quaternaires.

Diagnostic bactériologique

Prélèvements

Les prélèvements doivent idéalement être :

- ❖ Effectués avant la mise sous traitement .
- ❖ Être recueillis dans des flacons stériles à usage unique, ne contenant aucun additif en particulier aucun conservateur
- ❖ Les flacons sont fermés hermétiquement .
- ❖ Acheminés le plus rapidement possible au laboratoire,
- ❖ Si l'analyse doit être différée, ils doivent être conservés à + 4°C .

Tuberculose pulmonaire

- 1.Expectoration
 - 2.Tubages gastriques
 3. Les prélèvements sous fibroscopie:
 - Aspirations bronchiques
 - Lavages broncho-alvéolaires,
 - Le brossage bronchique
- Répéter les prélèvements
(au moins 3)

Tuberculose extra-pulmonaire :

- 1.Liquide pleural
- 2.LCR
- 3.Urines
4. Autres liquides de ponction : péricardique, articulaire,
- 5.Ganglionnaire
- 6.Hémocultures

Traitement d'un prélèvement

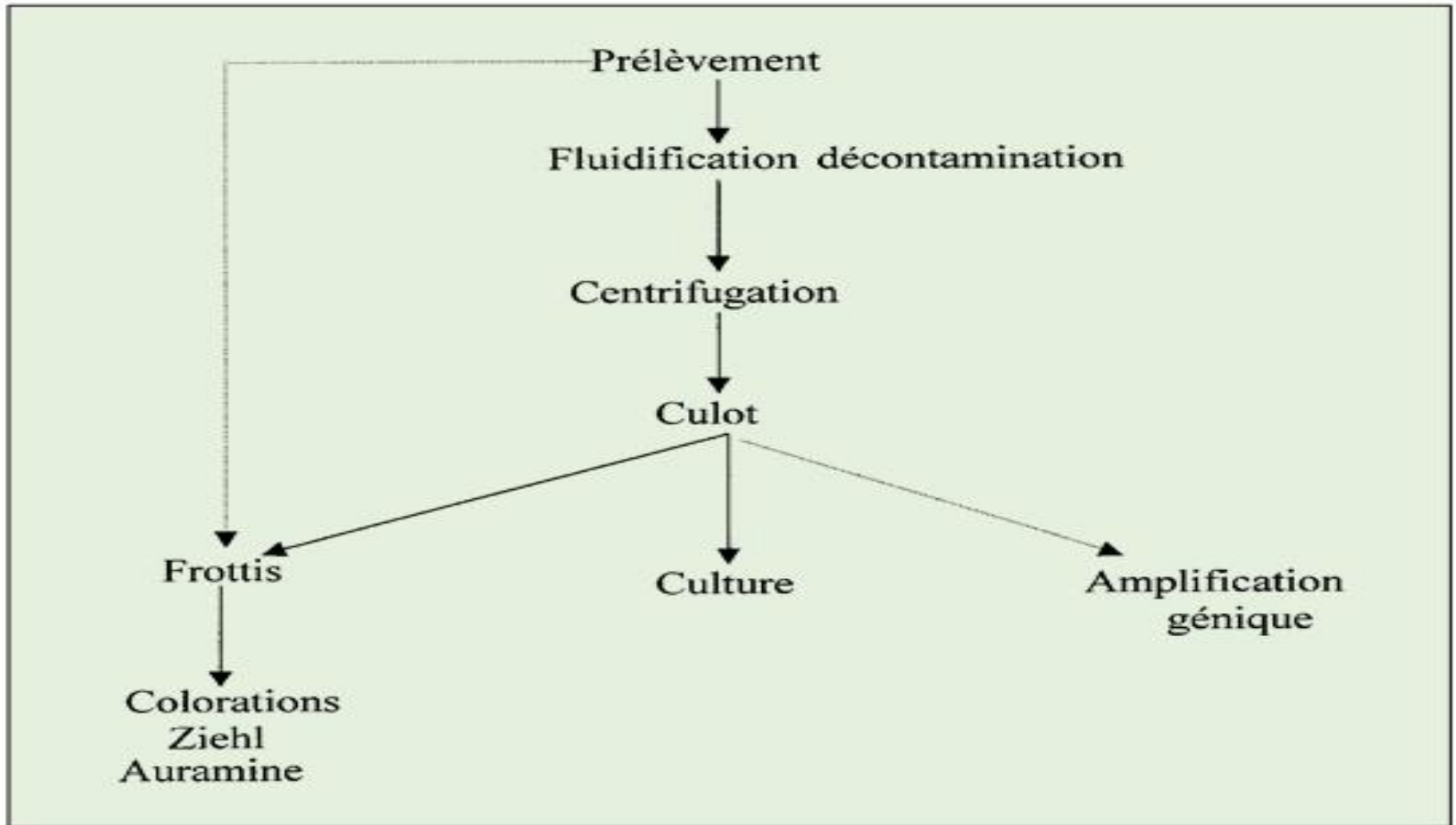
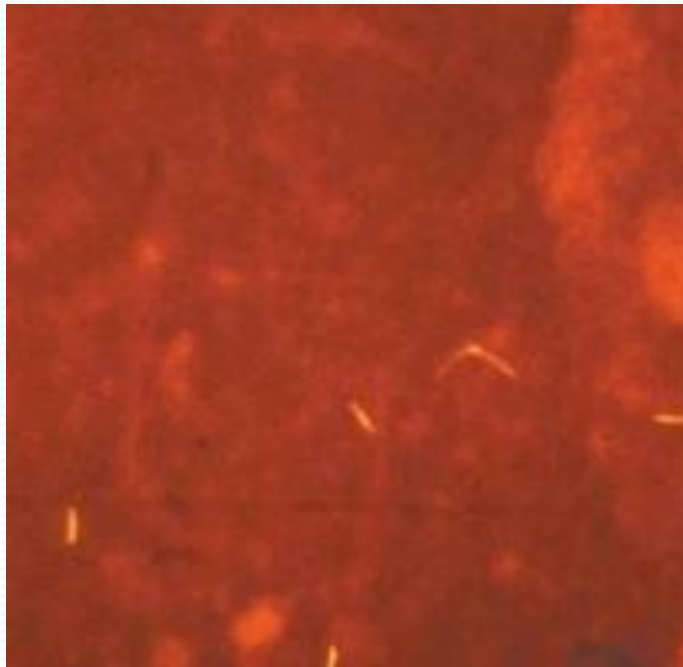
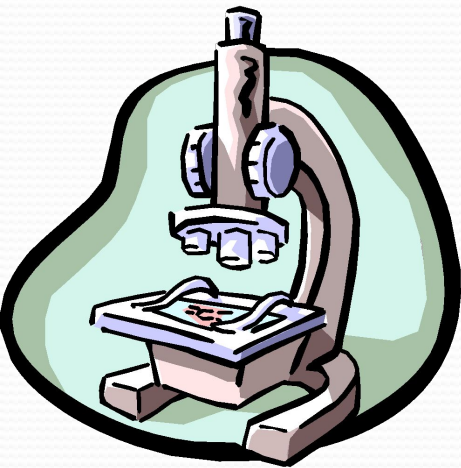


Figure 1 : traitement d'une expectoration pour mise en évidence des mycobactéries

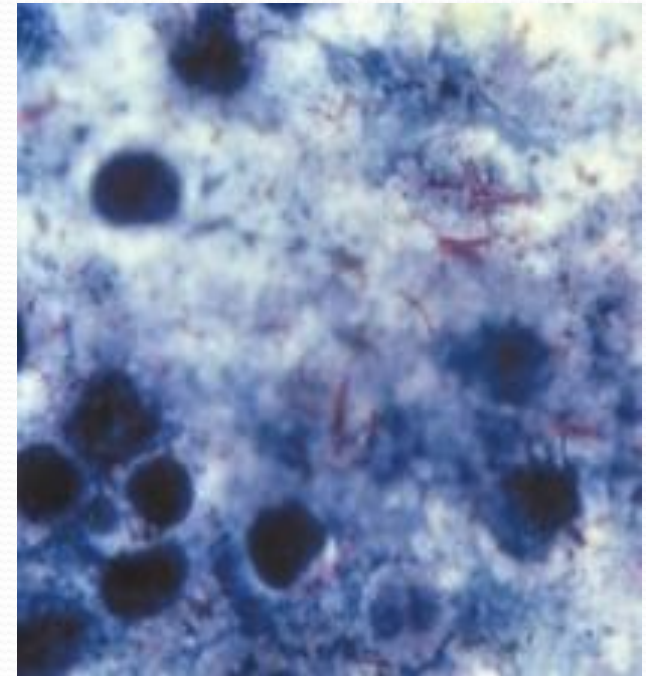


Examen microscopique

- ◆ Réalisation du frottis
- ◆ Fixation
- ◆ Coloration: Bacille non colorable par le Gram ☐
 - Coloration de Ziehl Neelsen
 - Coloration à l'Auramine



Colorisation à l'auramine : les bacilles apparaissent jaunes fluorescents sur fond rouge.



Colorisation de Ziehl Neelsen. Les bacilles apparaissent rouges sur fond bleu de la préparation

CULTURE

A. Milieux solides:

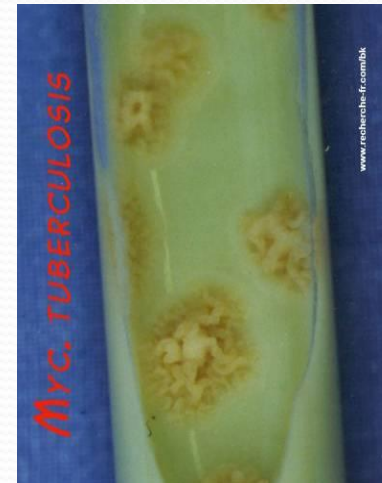
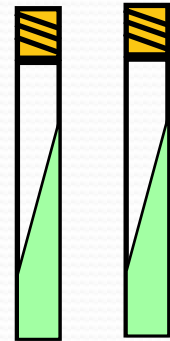
- Lowenstein Jensen: méthode de référence,
- Coletso,
- Middelbrook 7H11

= > **Résultat lent : 10 – 72 j**

B. Milieux liquides automatisés:

- ✓ BACTEC-MGIT,
- ✓ MB Redox.

= > **Résultat plus rapide**



M.tuberculosis



M.bovis

Identification

A. Identification classique = 3-4 semaines

- Morphologie des colonies
- Pigmentation
- Caractères biochimiques :
 - ✓ Réduction des nitrates
 - ✓ Recherche de l'acide nicotinique
 - ✓ Catalase
 - ✓ Sensibilité ou non aux inhibiteurs (PNB, TCH,.....)



Niacine Test : recherche de l'acide nicotinique

Antibiogramme

Méthode des proportions

- ✓ $N (\%) = \frac{\text{Nbre de colonies sur milieu +ATB}}{\text{Nbre de colonies sur milieu Témoin.}}$

*Résultats tardifs : 4 à 6 semaines après
l'ensemencement ; 2 à 3 mois après le
prélèvement*



Biologie moléculaire

● La PCR (Polymérase Chain Réaction)++++:

- ✓ La PCR est une technique d'amplification de déterminants génétiques .
- ✓ Elle permet le diagnostic , mais aussi la recherche de mutations génétiques à l'origine de la résistance de la souche aux antituberculeux

● Autres méthodes.

Traitement

Antituberculeux

- **L'isoniazide**
- **La rifampicine**
- **Le pyrazinamide**
- **L'éthambutol**
- **La streptomycine**

Le traitement actuel

- **Une quadrithérapie pendant les 2 premiers mois puis**
- **Une bithérapie associant isoniazide et rifampicine pendant 4 mois**

Vaccination : le B.C.G (Calmette et Guérin.)

→ Une souche avirulente de *Mycobacterium bovis*

- Repiquée plusieurs fois sur pommes de terre.
- **Après 230 passages, elle a perdu tout pouvoir pathogène.**
- Utilisée chez l'homme depuis 1921 comme vaccin antituberculeux.

→ **Assez sûr et bon marché.**

- **Efficace souvent, mais très variable dans ses résultats : 70 à 80% de protection.**

→ **Besoin impérieux et recherche active d'un vaccin plus efficace**