

6 • Examen des matières fécales : la coproculture

Plan du chapitre

- 1• Contextes
- 2• Objectifs
- 3• Les principaux micro-organismes responsables de diarrhées
- 4• La démarche diagnostique

Le malade atteint de diarrhée émet des selles liquides ou molles (non moulées), glaireuses ou hémorragiques. La diarrhée peut être aiguë ou chronique, fébrile ou non. Tous les épisodes diarrhéiques ne sont pas infectieux. Toutes les diarrhées infectieuses ne sont pas bactériennes. Parasites, virus et accessoirement levures y jouent un rôle important (tableau ci-après).

Seules seront envisagées les diarrhées d'origine bactérienne. Il en existe plusieurs types : toxinique, invasif et mixte (associant les deux).

Principaux micro-organismes responsables de diarrhées

Bactéries	<i>Salmonella, Shigella, Campylobacter, Yersinia, EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, Vibrio, Aeromonas, Staphylococcus, Bacillus, Clostridium</i>
Virus	<i>Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus, Agent de Norwalk</i>
Protozoaires	<i>Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, Balantidium</i>
Helminthes	<i>Schistosoma, Strongyloides, Ancylostoma, Necator, Trichuris, Trichinella</i>

1 • Contextes

En pratique bactériologique métropolitaine, il est possible d'identifier **plusieurs contextes épidémiocliniques**.

Il importe pour cela que le microbiologiste obtienne du prescripteur les quelques renseignements cliniques pertinents et minimum indispensables à la mise en œuvre au moindre coût de techniques performantes. Actuellement encore trop de demandes d'analyses pour diarrhées supposées bactériennes s'avèrent insuffisamment documentées et font de la coproculture le moins efficace des examens de bactériologie.

1- Identification des contextes minimaux :

◆ Adulte ou enfant de plus de deux ans et contexte par défaut

Réalisation d'une coproculture standard comprenant la recherche de *Salmonella* spp, de *Shigella* spp et de *Campylobacter* spp (voire *Yersinia enterocolitica* si le sujet est diarrhéique).

◆ Enfant de moins de deux ans

Réalisation d'une coproculture standard avec recherche supplémentaire des *E. coli* entéropathogènes en sachant que l'étiologie virale prédomine dans cette tranche d'âge.

◆ Contextes épidémiocliniques particuliers :

1. notion de voyage récent en «pays tropical»
2. malade sous traitement antibiotique
3. toxi-infection alimentaire collective (TIAC)
4. patients infectés par le VIH (SIDA notamment)
5. syndrome hémolytique et urémique (SHU)
6. intoxication alimentaire
7. syndrome cholériforme
8. détection de colonisation par des bactéries multirésistantes (BMR)
9. détection de portage chez le personnel de restauration

2 • Objectifs

➤ **L'objectif principal consiste à rechercher le(s) micro-organisme(s) pathogène(s) responsable(s) de la diarrhée.**

La finalité de la coproculture consiste à tenter d'isoler au sein d'une flore complexe un nombre limité d'espèces réputées pathogènes. La flore colique de l'adulte se caractérise en effet par une grande densité et une extraordinaire diversité. Elle contient de 10^9 à 10^{10} bactéries par gramme renfermant plus de 400 espèces différentes dont la très grande majorité est anaérobie stricte. Les Entérobactéries ne représentent que 5 à 10% de cette flore et parmi lesquelles *Escherichia coli* prédomine. Entérocoques, streptocoques, staphylocoques, lactobacilles et levures sont aussi présents mais en moins grande quantité.

- ◆ **La coproculture se pratique sur selles liquides, molles, glaireuses ou hémorragiques ou sur indications très précises pour des selles solides.**
- ◆ A coté de la culture de bactéries classiquement pathogènes, **on peut mettre en évidence des toxines dans les selles** (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*).
- ◆ En milieu hospitalier, **on peut rechercher, dans les selles, une bactérie d'infection nosocomiale** (par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* chez le nouveau né) une souche résistante particulière à un antibiotique (Entérocoque résistant à la vancomycine ou Entérobactérie productrice d'une bêta-lactamase à spectre étendu).
- ◆ **Lors d'une épidémie documentée on peut être amené à rechercher un portage de la bactérie pathogène** dans l'entourage d'un patient ou parmi le personnel soignant. Cette coproculture se pratique sur des selles mêmes solides.
- ◆ **Chez les cuisiniers le dépistage de bactéries entéropathogènes** (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella*), s'il reste légal, a une valeur discutée.
- ◆ **Patients infectés par le VIH**
Les diarrhées sont particulièrement fréquentes au cours de l'infection par le VIH. Elles relèvent de causes infectieuses multiples :
 - bactéries responsables des diarrhées aiguës banales ;
 - virus de type CMV, HSV, VIH ;
 - protozoaires tels *Entamoeba histolytica*, *Isospora belli* ou *Giardia intestinalis* ;
 - Cryptosporidies, Microsporidies.

3 • Les principaux micro-organismes responsables de diarrhées infectieuses

1- Principales bactéries responsables de diarrhée : coproculture standard de base et contexte par défaut

Dans le cas général habituel et en l'absence de critères spécifiques d'orientation on recherche systématiquement :

- ◆ ***Salmonella* spp** : la bactérie envahit l'entérocyte puis traverse la muqueuse et pénètre dans le tissu sous-muqueux où elle se multiplie. Le tableau est celui d'une gastro-entérite aiguë. La transmission se fait par les aliments souillés ou par porteur sain. Les *Salmonella* spp représentent encore aujourd'hui en France la principale cause de gastro-entérite bactérienne. Leur identification complète jusqu'au «sérovary» précis ne se justifie que pour les plus fréquents ou les plus pathogènes.
- ◆ ***Shigella* spp** : la bactérie pénètre dans les cellules épithéliales et s'y multiplie jusqu'à leur destruction. Le tableau est celui d'un syndrome dysentérique. La transmission est inter humaine. L'isolement de *Shigella* est en constante régression sous nos climats.
- ◆ ***Campylobacter* spp** : indépendamment de la sécrétion de toxines, cette bactérie du mucus peut s'internaliser dans les vacuoles intracytoplasmiques. La contamination est essentiellement alimentaire (volailles et porc) ou par l'intermédiaire de porteurs sains. Les *Campylobacter* spp représentent désormais la seconde cause de gastro-entérite bactérienne en France.
- ◆ ***Yersinia enterocolitica*** : bactérie invasive elle se manifeste le plus souvent par un tableau de gastro-entérite fébrile avec douleurs abdominales. Au stade des possibles complications articulaires sa détection dans les selles s'avère aléatoire. Sa porte d'entrée est alimentaire (animaux de boucherie) facilitée par sa relative psychrophilie. Son isolement n'est pas fréquent.

2- Enfant de moins de 2 ans

- ◆ Il était classique de rechercher en plus des bactéries responsables de diarrhées ci-dessus indiquées les ***Escherichia coli* entéropathogènes ou EPEC**, dans les selles liquides de nourrissons présentant un tableau de fièvre avec déshydratation. Le rôle de ces bactéries est actuellement discuté. Dans cette tranche d'âge les causes principales restent d'origine virale : *Rotavirus*, *Adenovirus*.
- ◆ **Cas particuliers du nouveau né.** Dans le méconium on se limite à la recherche de bactéries responsables d'infections néonatales : *Listeria monocytogenes*, *E. coli* K1 et surtout *Streptococcus agalactiae* (groupe B).

3- Bactéries à rechercher devant un tableau clinique particulier

- ◆ ***Aeromonas hydrophila* et *Plesiomonas shigelloides***, responsables de diarrhées sérosanglantes : entraînent une diarrhée de type toxinique avec absence de polynucléaires à l'examen direct.

Parmi les *Aeromonas* : *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* biogroupe *sobria* peuvent être isolés en culture prédominante dans des gastro-entérites survenant après absorption d'eaux polluées ou d'aliments contaminés en zone tempérée et en zone tropicale. *P. shigelloides* se rencontre principalement en zone tropicale, ailleurs son isolement est rare mais possible.

- ◆ ***Escherichia coli* 0157 et les autres *E. coli* producteurs de vérotoxine** : exposent à des diarrhées hémorragiques qui peuvent secondairement se compliquer, surtout chez l'enfant, d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les *E. coli* entéro-hémorragiques (ECH ou EHEC) sont non invasifs exprimant leur pouvoir pathogène au moyen d'une cytotoxine.

- ◆ ***Vibrio cholerae*** par la sécrétion d'une toxine est responsable du syndrome choléiforme : tableau clinique associant diarrhée liquidienne, vomissements et douleurs abdominales. Les selles sont abondantes, afécales, incolores avec des grumeaux blanchâtres (grain de riz).

La contamination se produit soit de manière inter-humaine, soit par l'eau souillée. L'interrogatoire relève le plus souvent la notion d'un voyage en zone d'endémie.

- ◆ D'autres bactéries peuvent être responsables de syndromes choléiformes comme les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC). Leur identification complète n'est pratiquée que par des laboratoires spécialisés. Les ETEC sont responsables de la classique diarrhée du voyageur (Turista, danse de Mexico). Le tableau clinique est en général peu sévère : diarrhée constituée de selles hydriques associée à des douleurs abdominales.

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) posent un problème de diagnostic différentiel avec les *Shigella*.

4- Les diarrhées secondaires à un traitement antibiotique : dysmicrobisme

- ◆ ***Clostridium difficile*** : il s'agit le plus souvent d'une diarrhée de moyenne importance accompagnant une antibiothérapie. Plus rarement le tableau évolue vers celui d'une colite pseudo-membraneuse. Primitivement liée à un déséquilibre de la flore intestinale, la diarrhée est secondaire au développement de *C. difficile* sécrétant de l'entérotoxine A et de la cytotoxine B. *C. difficile* est également à l'origine d'infection nosocomiale.

- ◆ D'autres micro-organismes peuvent entraîner des diarrhées par dysmicrobisme de flore et pulvulation corollaire : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* (diarrhée molle), *Clostridium perfringens* producteur d'entérotoxine.

5- Recherche de germes multi-résistants aux antibiotiques

A des fins épidémiologiques chez les malades hospitalisés dans des services à risques (réanimation ou oncohématologie), on peut être amené à rechercher dans leurs selles des Bactéries Multi-Résistantes telles : Entérocoque résistant à la vancomycine, SARM, Entérobactéries productrices de BLSE.

En milieu très spécialisé, dans le cadre de protocoles de surveillance de l'immunodéprimé, on réalise parfois une coproculture semi-quantitative de la flore fécale.

6- Les toxi-infections alimentaires (TIAC)

On distingue habituellement :

- ◆ Les toxi-infections alimentaires d'incubation courte (1 à 4 h) non fébriles dues à *S. aureus* et *B. cereus* ;
- ◆ Les toxi-infections alimentaires d'incubation longue (12 à 76 h) dues à *Salmonella* spp, *Y. enterocolitica*, *C. perfringens* et *C. botulinum*.

S'agissant des TIAC, la recherche de la bactérie ou de sa ou ses toxines se fait non seulement dans les selles, mais principalement dans les aliments, voire dans les vomissements ou l'aspiration gastrique, parfois dans le sérum du malade (toxine botulique). Ces techniques particulières à connotation médico-légale sortent du cadre strict de l'examen standard des selles.

7- Problèmes posés par les porteurs asymptomatiques de *Salmonella*

Pour les porteurs sains de *Salmonella* non typhiques ou paratyphiques, même s'il s'agit de personnels de soins ou d'employés des cuisines, les risques de transmissions sont faibles si les conditions et les règles universelles d'hygiène sont bien respectées. Il a été montré en effet que les *Salmonella* sont rarement détectées sur les doigts des porteurs digestifs.

4 • La démarche diagnostique

1- Prélèvement et transport

Les selles sont recueillies dès émission dans un récipient propre. Une aliquote du volume d'une noix au minimum est prélevée à l'aide d'une spatule ou d'un flacon cuillère puis transférée dans un conteneur hermétique type «pot à vis stérile machine». Un échantillon muco-purulent ou sanglant est choisi lorsqu'il en existe.

Un **écouvillonnage rectal** peut se révéler utile notamment chez le nourrisson et le petit enfant.

Les **biopsies de muqueuses rectales ou coliques** faites sous endoscopie sont analysées comme des matières fécales à l'exception de demande de recherche spécifique de mycobactérie.

Le **prélèvement** doit être immédiatement acheminé au laboratoire ou conservé au maximum une nuit à + 4°C afin d'éviter la dessiccation et la prolifération des bactéries et levures commensales. Au delà de ce délai on utilise un milieu de transport (glycérine tamponnée).

2- L'examen microscopique direct des selles

À l'état frais ou après coloration, dans le cas de selles liquides, **cet examen est important** pour orienter les cultures :

- ◆ **En cas de diarrhée à germes invasifs : il y a présence de leucocytes** (*Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter* spp)
- ◆ **En cas de diarrhée à germes entérotoxigéniques : il n'y a pas de leucocytes** (*V. cholerae*, *Aeromonas* spp, *C. difficile*).

Cependant, dans certaines diarrhées à bactéries invasives, la présence de leucocytes n'est pas toujours constante.

Après coloration l'examen du frottis permet d'apprécier le pourcentage des deux types tinctoriaux bactériens. Une flore équilibrée est composée majoritairement de bacilles à Gram négatif, mais avec toujours présence de bacilles à Gram positif. Toute perturbation notable de cet équilibre doit être signalée.

3- La mise en culture

Compte tenu de la diversité des espèces potentiellement responsables, il convient d'orienter la mise en culture selon les différents contextes épidémiocliniques significatifs.

◆ **Adulte ou enfant de plus de deux ans et contexte par défaut**

Toute coproculture doit systématiquement mettre en œuvre la recherche de ***Salmonella* et de *Shigella***. Outre un milieu sélectif d'isolement (gélose SS, XLD, DCL, ou Hektoen), un milieu d'enrichissement pour *Salmonella* est indispensable. Différents bouillons peuvent être proposés (Mueller-Kauffmann, Sélénite). Il est préconisé de repiquer le milieu d'enrichissement sur gélose sélective après 3 à 6 heures d'incubation à 37°C, afin d'éviter la multiplication des bactéries commensales moins bien inhibées passé ce laps de temps.

La recherche de ***Campylobacter* spp** est systématiquement réalisée chez les enfants et pour les adultes sur demande spéciale ou en présence de selles liquides. La culture se fait sur un milieu spécifique (milieu Karmali, de Skirrow ou de Butzler). Les cultures sont incubées pendant 48 heures minimum en micro-aérophilie.

La recherche de ***Yersinia enterocolitica*** n'est pratiquée que chez les enfants dont les selles sont diarrhéiques ou les adultes dans un contexte de polyarthrite réactionnelle. Les selles peuvent être placées dans un milieu d'enrichissement (milieu de Rappaport), incubées 24 h à 48 h à + 4°C et repiquées sur milieu spécifique pour *Yersinia* : milieu de Wauters (Gélose SS enrichie en désoxycholate), milieu à l'Irgasan-cefsulodine et novobiocine (CIN) incubé pendant 48 h à 30°C.

◆ **Enfant de moins de deux ans**

Les ***E. coli* (EPEC)** responsables de diarrhée de l'enfant de moins de deux ans se recherchent sur milieu type EMB ou Drigalski en plus des bactéries indiquées au paragraphe précédent.

◆ **En fonction de contextes épidémiocliniques particuliers**

- **Notion de voyage récent en «pays tropical» et syndrome cholériforme**

V. cholerae se recherche directement et après enrichissement en eau peptonée alcaline repiquée toutes les 3 heures sur milieu gélosé spécifique (par exemple TCBS).

***Aeromonas* spp** sur milieu gélosé au sang contenant de l'ampicilline, un milieu d'enrichissement est inutile.

- **Malade sous traitement antibiotique**

Pour ***Clostridium difficile***, la technique de référence reste la mise en évidence de la

cytotoxine dans les filtrats de selles et ne s'impose que pour des malades sous traitement antibiotique ou présentant une colite pseudo-membraneuse.

Le diagnostic de référence reste la détection de la toxine B sur les filtrats de selles par la recherche d'un effet cytopathogène sur des cultures cellulaires (fibroblastes, cellules Vero, MRC-5, Mac Coy). Méthode sensible et d'une excellente spécificité lorsque l'effet cytopathogène est neutralisé par un antiserum spécifique. La lecture s'effectue au bout de 24 - 48 heures.

Il existe des méthodes rapides immunoenzymatiques, alliant rapidité de détection et facilité d'emploi : détection de la toxine A (Immunocard toxine A - Meridian, BMD ; Tox A test - Bio Whittaker) ou celle des deux toxines A et B (test cytoclone A + B - Biotech) avec des délais de réponses inférieurs à trois heures. En outre, un test immunofluorométrique est automatisé (Vidas *C. difficile* toxine A Vitek Systems - bioMérieux).

Des méthodes de biologie moléculaire par amplification génique *in vitro* sont décrites avec des amorces de séquences répétitives ou non du gène de la toxine A, ou par hybridation directe à partir des filtrats de selles pour la toxine B. Elles n'intéressent que des laboratoires spécialisés, les méthodes immunoenzymatiques étant plus faciles et plus accessibles.

La recherche directe de l'entérotoxine A par technique ELISA est une méthode assez sensible et très spécifique. Cette entérotoxine doit être détectée sur les selles fraîches ou maintenues à - 80° C.

La recherche de la bactérie par culture nécessite des milieux spécifiques : gélose Columbia au sang à la céfoxitine, cyclosérine, fructose incubée en anaérobiose pendant 48 heures (milieu de George CCFA).

- **Syndrome hémolytique et urémique (SHU)**

L'isolement de *E. coli* O157 s'effectue sur gélose Mac Conkey au sorbitol ; les colonies sorbitol (-) sont agglutinées avec un latex sensibilisé.

- **Intoxication alimentaire (suspicion de botulisme par exemple)**

Cette pathologie ne relève pas de techniques de coproculture mais de la recherche et du typage de la toxine dans le sérum du malade et les aliments suspects.

- **Détection de la colonisation par bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR)**

Les **Entérocoques résistant à la vancomycine** sont isolés sur gélose type bile esculine contenant 6 mg/l de vancomycine.

Les **Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu** sont sélectionnées sur Drigalski contenant 0,5 ou 1 mg/l de céfotaxime (ou à partir de ce milieu sélectif). La présence d'une BLSE chez la ou les souches est affirmée par la mise en évidence d'une synergie entre l'acide clavulanique, le céfotaxime, la ceftazidime, le céfépime et l'aztréonam.

- **Détection de portage chez le personnel de restauration**

Les recherches de *Salmonella spp* et de *Staphylococcus aureus* chez les cuisiniers ne diffèrent pas des méthodes classiques. On peut légitimement s'interroger sur leur sensibilité et leur intérêt réel.

4- L'antibiogramme

L'antibiogramme est impératif pour *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* et pour *V. cholerae* en milieu endémique (prophylaxie par les sulfamides).

En tout état de cause il est parfaitement licite de pratiquer un antibiogramme pour toutes bactéries pathogènes isolées de coproculture.

Bibliographie

AVRIL J.L. Diagnostic microbiologique des diarrhées infectieuses aiguës. Rev Fr de gastroentérologie. 1995; 309 : 810-813.

BARBUT F., SEBALD M., PETIT J.C. Méthodes de diagnostic au laboratoire des infections à *Clostridium difficile*. Revue française des Laboratoires. 1992 ; 236 : 102-109.

DODIN A., FOURNIER J.M. Méthodes de laboratoire pour le diagnostic du Vibron cholérique et des autres Vibrions. 1992, Institut Pasteur : 148 p.

FORESTIERC., JOLY B. *Escherichia coli* producteurs de verotoxines : des tests fiables pour un danger croissant ? Bull. Soc. Fr. Microbiol., 1997 ; 12 : 13-15.

GAILLARD J.L. Les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques. Infectiologie et Immunologie. 1995 ; 2 : 121-127.

KAPER J.B., MORRIS J.G., LEVINE M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995 ; 8 : 48-86.

KNOOP F.C., OWENS M., CROCKER I. *Clostridium difficile* : Clinical disease and diagnosis. Clin. Microbiol. Rev. 1993 ; 6 : 251-265.

RAMBAUD J.C., RAMPAL P. Diarrhées aiguës infectieuses. In progrès en hépato-gastroentérologie Douin Ed. Paris, 1993 : 186 p.

Circulaire DGS n°38, DGAL/SDHA n°95-89 du 20 avril 1995 relative aux syndromes hémolytiques et urémiques. NOR : SANP9510105C.