

18• Isolement et identification des bactéries anaérobies

Plan du chapitre

- 1• Contextes cliniques
- 2• Objectifs
- 3• Méthodes de mise en évidence
- 4• Sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries anaérobies sont responsables d'une grande variété d'infections localisées ou généralisées. Dans plus de 80% des cas il s'agit d'une infection mixte, associant bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et anaérobies strictes.

La plupart de ces bactéries se développent lentement. Leur isolement et leur identification demandent un certain délai. Leur mise en évidence reste toujours délicate.

Un certain nombre d'indices permettent de suspecter leur présence :

- mauvaise odeur des échantillons, présence de gaz dans la lésion,
- localisation de la suppuration (abcès sous maxillaire ou cervical, pleurésie purulente, péritonite, abcès de la sphère gynécologique).

Les échecs de culture sont fréquents, les principales causes en sont : mauvais prélèvements, mauvaises conditions de transport, méthodes de culture inadéquates, malgré l'utilisation d'enceintes anaérobies (jarre ou chambre).

1• Contextes cliniques

Deux grands types d'infections :

➔ **Les infections à *Clostridium* sécréteurs de toxines.** Ils sont généralement d'origine exogène. Ils survivent dans la nature grâce à leur spore. On distingue :

- ◆ **les toxi-infections** (*Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*). Le germe pénètre dans l'organisme à l'occasion d'une blessure (*Clostridium tetani*), il se développe localement, sécrète sa toxine qui provoque la maladie (tétanos). *C. perfringens* responsable des gangrènes gazeuses (myonécroses, cellulites, fasciites), pénètre à l'occasion de blessures mais peut être d'origine endogène secondaire à des lésions de la paroi digestive. *Clostridium difficile* pénètre dans l'organisme par voie digestive mais dans des conditions normales

il ne peut se développer dans le tube digestif. La destruction d'une flore de barrière par une antibiothérapie permettra sa multiplication et la sécrétion des toxines.

- ◆ **les intoxications** (*Clostridium botulinum*). C'est l'ingestion de la toxine préformée qui est responsable de la maladie.
- ➔ **Les infections mixtes** : elles se développent au voisinage des muqueuses. Les anaérobies strictes sont associées à d'autres bactéries, elles peuvent se compliquer de métastases infectieuses à distance.

2• Objectifs

➔ Isolement et identification des bactéries anaérobies strictes :

- La recherche des anaérobies ne se pratique ni pour les intoxications ni pour les toxi-infections d'origine exogène. Le diagnostic est essentiellement clinique.
- L'origine des infections à anaérobies est essentiellement endogène, la composition de ces flores est importante à considérer car de sa connaissance dépende la nature des espèces isolées dans leur voisinage (tableau 1).

➔ Les bactéries anaérobies sont surtout recherchées dans les prélèvements suivants :

- hémocultures,
- liquides de ponction (pleurale, péricardique, articulaire),
- abcès du poumon : dans la mesure où le prélèvement a été réalisé grâce à une technique protégeant le prélèvement de la contamination bucco-dentaire),
- ostéite,
- abcès du cerveau,
- péritonite,
- abcès abdominaux ou gynécologiques.

Les anaérobies ne doivent pas être recherchés dans un prélèvement hébergeant habituellement une flore commensale : crachats, selles, prélèvements vaginaux.

La recherche de *C. difficile* lors d'une diarrhée au décours d'un traitement antibiotique est un cas particulier.

Tableau 1 : Les anaérobies de la flore endogène (d'après SM Finegold)

Tableau 1 : Les anaérobies de la flore endogène (d'après SM Finegold)	
<p><u>Peau</u></p> <p><i>Propionibacterium acnes</i> +++ <i>Peptostreptococcus</i> spp</p>	<p><u>Flore buccale</u></p> <p><i>Prevotella</i> pigmentées <i>Porphyromonas</i> spp <i>Prevotella</i> groupe <i>oralis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp <i>Eubacterium</i> spp <i>Actinomyces</i> spp</p>
<p><u>Flore vaginale</u></p> <p><i>Lactobacillus</i> : +++ <i>Prevotella bivia</i>, <i>P. disiens</i> <i>Prevotella</i> pigmentées <i>Peptostreptococcus</i> spp</p>	<p><u>Flore colique</u></p> <p><i>Bacteroides</i> groupe <i>fragilis</i> +++ <i>Bilophila wadsworthia</i> <i>Peptostreptococcus</i> spp <i>Clostridium</i> spp <i>Bifidobacterium</i> spp <i>Eubacterium</i> spp</p>
+++ : germe dominant	

3• Méthodes de mise en évidence des anaérobies

1- Prélèvement et transport

L'une des principales causes d'échec d'isolement des bactéries anaérobies est la mauvaise qualité du prélèvement et/ou du transport.

La recherche de ces bactéries peut se faire soit sur un prélèvement aspiré : seringue ou pipette (les pipettes en plastique ont des propriétés oxydantes qui les rendent toxiques pour les bactéries anaérobies), soit sur un écouvillon (écouvillon d'alginate ou en dacron), il doit être obligatoirement placé dans un milieu de transport. Le mieux est d'utiliser une seringue purgée d'air.

Les prélèvements à la seringue ou à la pipette ont deux avantages par rapport aux prélèvements sur écouvillon :

- ◆ ils permettent de prélever le pus au niveau du foyer infecté, en évitant la contamination par les flores du voisinage, ce qui est plus délicat avec un écouvillon,
- ◆ ils évitent la dessiccation ou la rétention de bactéries dans l'écouvillon, et l'exposition à l'oxygène,
- ◆ ils permettent de noter les caractères organoleptiques.

En pratique cependant, l'écouvillon demeure un moyen de prélèvement utilisé.

Après prélèvement, il faut veiller à :

- ◆ empêcher la dessiccation du produit pathologique,
- ◆ protéger les bactéries de l'oxygène de l'air.

Le milieu de transport idéal doit préserver la multiplication ultérieure des anaérobies, mais aussi des aérobies.

Il doit contenir des substances réductrices.

La plupart des milieux de transport commercialisés ont pour base le milieu de Stuart. Les meilleurs milieux sont gélosés: Portagerm (bioMérieux), TGV anaérobie (Sanofi-Pasteur), Port A Cul (Becton Dickinson).

2- Méthodes d'orientation rapide

L'isolement et l'identification demandent un délai de quelques jours à quelques semaines.

Il importe de signaler rapidement la présence des anaérobies dans un prélèvement.

- ◆ L'aspect du pus est souvent très évocateur : pus abondant d'odeur nauséabonde.
- ◆ L'examen du frottis après coloration par la méthode de Gram.
- ◆ La flore bactérienne est abondante et polymorphe associant des bacilles et des cocci à Gram positif et négatif.

Trois aspects peuvent se rencontrer :

- le pus est très évocateur avec une flore polymorphe typique (60% des suppurations),

- la flore peu abondante mais associant plusieurs catégories de bactéries (20 à 30% des suppurations),
- l'examen direct non évocateur, les cultures sont monomicrobiennes (10 à 15% des cas).
- ◆ On peut utiliser des méthodes immuno-enzymatiques pour *Clostridium difficile* pour mettre en évidence les toxines dans les selles.
- ◆ La localisation de la suppuration permet de préjuger des anaérobies que l'on peut isoler (tableau 2).

3- Mise en culture

↳ Les milieux

L'isolement nécessite des milieux gélosés, contenant de nombreux facteurs de croissance et rendus sélectifs grâce à l'addition d'antibiotiques.

Il est important de toujours utiliser des milieux désoxygénés (régénérés), fraîchement préparés et conservés en anaérobiose avant leur utilisation.

Différents milieux ont été proposés, ils peuvent être limités :

- ◆ Milieu gélosé pour les bacilles à Gram négatif (exemple Schaedler au sang avec vancomycine (7,5 mg/l) et néomycine (75 mg/l)). Ce milieu permet l'isolement des *Bacteroides* du groupe *fragilis*, des *Prevotella*, des *Fusobacterium*.
- ◆ Gélose Columbia au sang et au phényléthylalcool (4,2 g/100 ml) spécifique des bactéries à Gram positif et des *Porphyromonas*.

- ◆ Pour les *Clostridium* : TSN, gélose au jaune d'œuf et néomycine, Columbia au sang avec cyclosérine et cefoxitine pour *C. difficile*.

Certaines bactéries peuvent avoir des difficultés à se développer sur une gélose au sortir de l'organisme. Il faut toujours associer un bouillon anaérobie à un milieu gélosé. Ce bouillon est repiqué après 48 à 72 heures sur des géloses sélectives.

↳ Les conditions d'anaérobiose

Il existe actuellement des sachets permettant de faire l'anaérobiose en moins d'une demi heure sans catalyseur.

Elle est réalisée dans des jarres ou des sacs en plastique fermés hermétiquement.

Les chambres anaérobies sont très utiles, mais pas indispensables pour l'isolement des anaérobies, elles nécessitent une surveillance constante.

L'alternative peut être réalisée par un système permettant de faire le vide dans une jarre et d'injecter un mélange gazeux.

Il est nécessaire de bien vérifier l'anaérobiose réalisée à l'aide d'un indicateur d'oxydo-réduction (bande de papier buvard imprégné de bleu de méthylène ou de résazurine).

4- Identification

L'identification s'effectue en deux temps :

↳ Identification présomptive

Elle utilise des méthodes simples accessibles par tous les laboratoires :

Tableau 2 : Répartition des anaérobies dans les suppurations mixtes

	Suppurations abdominales	Pus gynécologiques	Pneumonie de déglutition	Abcès du poumon Pleurésie purulente	Tête et cou	Tissus mous
<i>Bacteroides fragilis</i>	+++	(+)	/	+	(+)	+
<i>B. du groupe fragilis</i>	++	(+)	(+)	+	(+)	+
<i>Prevotella bivia</i>	/	+++	/	0	0	
<i>Prevotella oralis</i>	/	+	+++	+++	++	+
<i>Porphyromonas</i> spp	/	+	(+)	(+)	+	++
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	/	+	++	+++	++	/
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	/	/	/	/	++	/
<i>Peptostreptococcus</i> spp	+	++	++	++	++	++
<i>Actinomyces</i> spp	/	++	+	++	++	(+)
<i>Clostridium perfringens</i>	++	/	+	/	0	+

+++ : espèce présente dans la majorité des prélèvements

+ à ++ : présence dans 20 à 80 % des prélèvements

(+) : espèces isolées dans 10 à 20 % des prélèvements

- ◆ étude de la mobilité entre lame et lamelle en contraste de phase,
- ◆ coloration de Gram,
- ◆ recherche d'une oxydase et d'une catalase,
- ◆ croissance en présence d'antibiotiques (kanamycine, colistine, vancomycine) ou d'inhibiteurs (bile, vert brillant),
- ◆ étude de la fermentation des sucres, de la production d'indole et d'une gélatinase à l'aide d'une galerie miniaturisée,
- ◆ étude des caractères enzymatiques grâce à une galerie d'identification rapide.

Les bactéries les plus fréquentes sont identifiées par ces méthodes simples à mettre en œuvre : *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ureolyticus*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum*, *F. necrophorum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bilophila wadsworthia*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces meyeri*.

Cette orientation présomptive permet la détermination du genre bactérien de la grande majorité des anaérobies (ce qui est souvent suffisant).

➔ Identification définitive

L'identification précise de certaines espèces est plus délicate et nécessite des examens complémentaires : chromatographie en phase gazeuse, biologie moléculaire.

4 • Sensibilité aux antibiotiques

Les bactéries anaérobies provoquent un nombre important d'infections qui nécessitent une thérapie spécifique.

Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont résistants à de nombreux antibiotiques. Certaines espèces sont sécrétrices de β -lactamases, d'autres sont résistantes au métronidazole. L'isolement, l'identification et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques sont aussi importants pour ces bactéries que pour les autres pathogènes (tableau 3).

Tableau 3 : Antibiotiques à étudier pour une bactérie anaérobie

<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	amoxicilline amoxicilline + ac. clavulanique céphamycine (céfoxitine ou céfotétan) céfotaxime imipénème clindamycine métronidazole
Autres bacilles à Gram négatif (<i>Prevotella</i>, <i>Fusobacterium</i>)	amoxicilline amoxicilline + ac. clavulanique métronidazole
Cocci à Gram + et Bacilles à Gram + non sporulé (<i>Propionibacterium</i>, <i>Actinomyces</i>)	pénicilline métronidazole vancomycine ofloxacine (pour <i>Propionibacterium</i>)
<i>Clostridium</i>	ampicilline amoxicilline + ac. clavulanique métronidazole vancomycine clindamycine

Bibliographie

- BARTLETT J.G. Anaerobic bacterial infections of the lung and pleural space. Clin. Infect. Dis. 1993; 16, 248-255
- BROOK I. Comparison of two transport systems for recovery of aerobic and anaerobic bacteria from abscesses. J. Clin Microbiol. 1987; 25-2020-2022.
- CITRON D.M. Specimen collection and transport, Anaerobic culture techniques, and identification of anaerobes. Rev Infect Dis. 1984; 6- S51 -S58.
- JOUSIMIES-SOMER H.R., FINEGOLD S.M. Problems encountered in clinical anaerobic bacteriology. Rev Infect Dis. 1984; 6- S45 - S49.
- SÉDALLIAN A. Mise en évidence des bactéries anaérobies. Rev. Franç. Lab. 1993; 255 : 21-24
- SUMMANEN P., BARON E.J., CITRON D.M., STRONG C.A., WEXLER H.M., FINEGOLD S.M. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual 5^e ed, Star publishing company, Belmont California (USA), 1993.