

**République Algérienne Démocratique et populaire**

**Ministre de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana**



**Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre**

**Département des sciences biologiques**

**Mémoire de fin d'Etude**

**En vue de l'obtention d'un diplôme de Master en sciences biologiques**

**Spécialité: Microbiologie Appliquée**

**Thème**

**Isolement et identification des micro-organismes  
chez les nourrissons diarrhéiques**

**Soutenu le : 11/07/2019**

**Présenté par :**

- **KADI AHMED**
- **ESSAADI ASSIA**

**Devant le jury**

<b>Mme KELBAZA.K</b>	<b>Président</b>	<b>(MCB)</b>	<b>UDB KHEMIS MILIANA</b>
<b>Mme HALFAOUI.Z</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>(MAA)</b>	<b>UDB KHEMIS MILIANA</b>
<b>Mme ZAOUADI.N</b>	<b>Examinatrice</b>	<b>(MAA)</b>	<b>UDB KHEMIS MILIANA</b>
<b>M<sup>r</sup> AMROUCHE.Z</b>	<b>Promoteur</b>	<b>(MCB)</b>	<b>UDB KHEMIS MILIANA</b>

**Année universitaire : 2019-2020**

## Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier dieu, le généreux, le tout puissant qui nous a donnés la force et le courage, la volonté et les moyens nécessaires pour réaliser ce modeste travail.

Mes premières reconnaissances vont à notre encadreur le professeur **AMROUCHE** Zohir d'avoir accepté de diriger ce travail, ses apports et ses conseils toujours judicieux et ses encouragements. Nous lui disons, Merci.

Ensuite pour les membres du jury qui ont accepté d'évaluer et de juger notre travail.

Mes gratitudes vont également pour mes enseignants de Master qui m'ont donné l'envie de poursuivre dans cette voie, Mes remerciements s'adressent aussi aux enseignants et tout le personnel du département des sciences biologiques qui m'ont aidé tout au long de notre cursus universitaire.

Enfin, sincères remerciements vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, pour leur soutien et leurs encouragements, . . . merci à tous.

# Dédicaces

*Je dédie ce mémoire à....*

**A mes très chers parents,**

*Grace à dieu et à ceux que je suis devant vous aujourd'hui, leur soutien sans faille, sans qui rien n'aurait été possible, tout au long de mon cursus vous représentez pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse, et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour ma formation.*

**A mes très chère sœurs imene ;manel ;merieme.**

*Une très bonne vie et plus de réussite.*

**A mes très chères frères Mohamed et abdo.**

*Je vous souhaite un très bon avenir, plein de joie, de bonheur, réussite et de sérénité.*

**A tous mes enseignants, mes amies sans exception et tous ce qui m'aiment Merci à tous.**

**A mon marie et ma petite ange iline.**

*Je vous souhaite une très long vie ; plein de joie et amour ; réussite et de sérénité.*

*Essaadi.A*

## *Dédicaces*

*A ma famille,*

Pour votre soutien tout au long de mes études,  
Pour votre patience et votre aide pendant ce travail de thèse.

*A ma petite famille,*

*A ma fille,*

Pour tout le bonheur qu'elle m'apporte chaque jour.

*Kadi. A*

## **Résumé :**

La diarrhée aiguë est l'émission de selles anormalement fréquentes et liquides en dehors de tout contexte chronique évident. Fréquent chez le nourrisson pour lequel elles représentent un important motif de consultation, les diarrhées exposent à un risque de déshydratation aiguë, d'autant plus rapide et grave qu'elles sont associées à des vomissements.

Notre étude a pour but d'un isolement et identification des germes bactériens Chez le nourrisson diarrhéique au niveau de service de pédiatre à l'hôpital, En analysant les prélèvements des selles par les examens macro et microscopiques et avec les méthodes coprocultures après en à rechercher les micro organismes responsable des diarrhées  
ex : *Shigella ; Salmonella ; Campylobacter*

Enfin, le traitement est avant tout celui de la déshydratation, soit préventif, soit curatif. Il y a parfois un traitement étiologique à réaliser.

**Mots-clés :** Diarrhée aiguë, déshydratation aiguë, selle, nourrisson, isolement, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, soluté oral de réhydratation.

## **Abstract:**

Acute diarrhea is the emission of unusually frequent and liquid stools outside of any obvious chronic context. Diarrhea is common in infants for whom it is an important reason for consultation, and is at risk of acute dehydration, which is all the more rapid and serious because it is associated with vomiting.

The aim of our study is to isolate and identify bacterial germs in infants with diarrhea at the pediatrician service level in the hospital, By analyzing the stool samples by macro and microscopic examinations and with the methods of stool cultures after to seek the microorganisms responsible for diarrhea ex: *Shigella*; *Salmonella*; *Campylobacter*.

Finlay; The treatment is primarily that of dehydration, either preventive or curative. There is sometimes an etiological treatment to be

**Keywords:** Acute diarrhea, acute dehydration, stool, infant, isolation, Salmonella, Campylobacter, Shigella, oral rehydration solution.

## ملخص :

الإسهال الحاد هو انبعاث البراز السائل والمتكرر بشكل غير عادي خارج أي سياق زمني واضح، الإسهال شائع لدى الرضع كثيرا و يعتبر سبباً مهماً للاستشارة، وهو معرض لخطر الجفاف الحاد، وهو الأمر الأكثر سرعة وخطورة لأنه مرتبط بالقيء.

الهدف من دراستنا هو عزل وتحديد الجراثيم البكتيرية عند الرضع المصابين بالإسهال

على مستوى جناح طب الأطفال في المستشفى ، من خلال تحليل عينات البراز عن طريق الفحوصات الميكروسكوبية وطرق زراعة البراز. نبحث أخيرا عن الكائنات الحية المسؤولة عن الإسهال لدى الرضيع مثلا شيغيلا، كامبيلوباكتر، سالمونيلا.

أخيرا، يجب علينا ان نعالج الجفاف سواء وقائيا أو علاجيا ، و أحيانا هناك علاج اتيولوجي آخر علينا القيام به و إتباعه .

الكلمات المفتاحية: إسهال حاد ، جفاف حاد ، براز ، رضيع ، تشخيص ، عزل ، سالمونيلا

كامبيلوباكتر ، شيغيلا ، محلول معالجة الجفاف

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	14
<b>Chapitre I : la diarrhée aigue chez les nourrissons</b>	
<b>1. Définition et types des diarrhées</b> .....	16
<b>2. Prévalence et épidémiologie</b> .....	16
<b>3. Les symptômes de la diarrhée chez le bébé</b> .....	17
<b>4. Cause de diarrhée chez le bébé</b> .....	17
<b>5. Enumère les principaux agents infectieux</b> .....	18
<b>5.1 Les infections virales</b> .....	18
<b>5.2 Les bactéries entéro-toxinique</b> .....	18
<b>5.3 Les bactéries invasives</b> .....	19
<b>5.4 Les infections parasitaires</b> .....	19
<b>5.5 Les infections extra digestives</b> .....	19
<b>5.6 Les autres causes</b> .....	19
<b>6. Les étiologies</b> .....	20
<b>6.1 Les virus</b> .....	20
<b>6.2 Les bactéries</b> .....	22
<b>6.3 Les parasites</b> .....	26
<b>7. Physiopathologie</b> .....	28
<b>7.1 Mécanismes cellulaires et moléculaires</b> .....	28
<b>7.2 Conséquences physiologiques</b> .....	30
<b>8. Aspects cliniques</b> .....	32
<b>8.1 Entérite virale</b> .....	32
<b>8.2 Diarrhée invasive bactérienne</b> .....	32
<b>8.3 Diarrhée par production de toxine</b> .....	33
<b>9. Diagnostique</b> .....	34
<b>9.1 Analyse séméiologique de la diarrhée</b> .....	34
<b>9.1.1. Caractères des selles</b> .....	34
<b>9.1.2. Signes associes</b> .....	34
<b>9.2 Recherche de signes de gravite</b> .....	35
<b>9.2.1. Gravité de la déshydratation</b> .....	35
<b>9.2.2. Autres signes de gravité</b> .....	35
<b>9.3 Recherche étiologique</b> .....	35
<b>10. Définir un état de déshydratation</b> .....	36
<b>11. les signes cliniques propres a la déshydratation extra –intra cellulaire</b> .....	38
<b>11.1 État de choc par hypo volémie</b> .....	38
<b>11.2 Le diagnostique de déshydratation aigue est clinique</b> .....	38
<b>Chapitre II : Les agents responsable a la diarrhée aigue</b>	
<b>1. Clostridium difficile</b> .....	41
<b>2. Campylobacter jejuni</b> .....	42
<b>3. Escherichia coli</b> .....	43
<b>4. Salmonella</b> .....	44
<b>5. Shigella</b> .....	45

6. <i>Yersinia</i> .....	46
7. <i>Vibrio cholerae</i> .....	47
8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	47
<b>Chapitre III : Traitement et prophylaxie des diarrhées aiguës chez les nourrissons</b>	
1. Le principe.....	50
2. La thérapie par réhydratation orale TRO.....	50
3. Solution de SRO.....	51
4. Prophylaxie.....	52
5. Diététique.....	52
6. Médicaments Anti-diarrhéiques.....	52
7. Antibiotiques.....	53
<b>Etudes cliniques au laboratoire :</b>	
1. Protocol.....	56
2. Déterminer l'étiologie d'une diarrhée.....	56
3. Prélèvement des selles.....	58
3.1 Examen macroscopique des selles.....	59
3.2 Examen microscopiques des selles.....	59
3.3 Frottis des selles coloré au Gram.....	60
4. Coproculture.....	61
5. Coproculture standard.....	62
5.1 Recherche des <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> .....	62
5.1.1. Ensemencer un milieu d'enrichissement en <i>Salmonella</i> .....	62
5.1.2. Ensemencer un milieu d'isolement sélectif.....	63
5.1.3. Isoler sur un milieu sélectif, le bouillon d'enrichissement en <i>Salmonella</i> .....	64
5.1.4. Repérer les colonies suspectes sur le milieu sélectif ensemencé.....	64
5.1.5. Identification des colonies suspectes.....	65
5.1.6. Démarche d'identification des colonies suspectes sur SS ou Hektoen.....	66
5.2 Recherche de <i>Campylobacter</i> .....	67
5.3 Recherche de <i>Yersinia</i> .....	72
6. Coproculture complémentaire.....	74
6.1 Recherche des EPEC.....	74
6.2 Recherche des EHEC.....	75
6.3 Recherche des ETEC et des EIEC.....	75
6.4 Recherche de <i>Vibrio cholerae</i> .....	75
6.5 Recherche de <i>Vibrio non cholerae</i> , <i>Aeromonas</i> et <i>Proteus shigelloides</i> .....	76
6.6 Recherche de microorganismes responsable des diarrhées post-antibiotiques.....	77
6.6.1. Recherche de <i>Clostridium difficile</i> .....	77
6.6.2. Recherche de <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	79
6.6.3. Recherche de <i>Clostridium perfringens</i> .....	79
6.6.4. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	80
7. Conclusion.....	82
<b>Références bibliographiques</b> .....	83

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Principaux agents responsables de diarrhées aiguës infectieuses.....	28
<b>Tableau 2 :</b> Principaux symptômes observés en fonction des mécanismes et de l'étiologie des diarrhées aiguës.....	34
<b>Tableau 3 :</b> Besoins hydrosodés et volume sanguin selon l'âge.....	37
<b>Tableau 4 :</b> Signes cliniques de déshydratation.....	39
<b>Tableau 5 :</b> Caractéristiques des 5 variétés d' <i>Escherichia coli</i> responsable de diarrhée. ....	44
<b>Tableau 6 :</b> Quelques caractères différentiels d'espèces de <i>Campylobacter</i> et genre apparenté.....	72
<b>Tableau 7 :</b> Caractérisation des différents biotypes.....	74

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Les types de la coproculture .....	57
<b>Figure 2</b> : Recueil des selles.....	58
<b>Figure 3</b> : Dispositif COPAN fécal swab.....	58
<b>Figure 4</b> : Frottis de selles après coloration de Gram (x1000) .....	60
<b>Figure 5</b> : protocole de la coproculture standard.....	62
<b>Figure 6</b> : Les milieux d'isolement classiques (conviennent pour <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> ).....	64
<b>Figure 7</b> : <i>Campylobacter</i> en culture pure Gram - x100.....	68
<b>Figure 8</b> : Filtration au travers d'un filtre Millipore 0.45µm.....	70
<b>Figure 9</b> : Culture a l'emplacement du filtre Millipore.....	70
<b>Figure 10</b> : Culture de <i>Campylobacter</i> 48h a 37°C en microaérobie.....	71
<b>Figure 11</b> : Profil sur API Campy d'une souche de <i>Campylobacter jejuni</i> .....	71
<b>Figure 12</b> : <i>Yersinia enterocolitica</i> sur CIN après 24H a 30°C.....	73
<b>Figure 13</b> : <i>Yersinia enterocolitica</i> sur CIN après 48H a 30°C.....	73
<b>Figure 14</b> : Gram d'un frottis de selles avec <i>Clostridium difficile</i> .....	77
<b>Figure 15</b> : Culture de <i>Clostridium difficile</i> sur chromID <i>C.difficile</i> .....	78
<b>Figure 16</b> : <i>Klebsiella oxytoca</i> en culture pure sur Hektoen.....	79
<b>Figure 17</b> : <i>Clostridium perfringens</i> sur gélose au sang.....	80
<b>Figure 18</b> : <i>Staphylococcus aureus</i> sur Chapman.....	81

## Liste des abréviations

- AMP** : Adénosine monophosphate cyclique.
- API** : Appareils et Procédés d'Identification
- ARN** : Acide ribonucléique.
- BCP** : Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol.
- CAMP** : *Campylobacter*.
- CCFA** : Milieu contient le Cyclosérine, Céfoxitine, fructose et l'agar.
- CFTR** : Cystic fibrosis transmembrane conductance régulator.
- CNR** : Centre national de référence .
- CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone.
- C°** : Degré Celsius.
- DCLS** : Milieu gélose de saccharose, lactose, citrate et désoxycholate.
- EA-AggEC** : *Escherichia coli* entéro-agrégant.
- EHEC** : *Escherichia coli* entéro-hémorragique.
- EIEC** : *Escherichia coli* entéro-invasifs.
- ELISA** : Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée.
- EMB** : Milieu sélectif eosine methylene bleu agar.
- EPEC** : *Escherichia coli* entéro-pathogènes.
- ESPGHAN** : société européenne.
- ETEC** : *Escherichia coli* entéro toxinogènes.
- g** : Gramme.
- GDH** : Enzyme Glutamate Dehydrogenase.
- GMP** : Guanosine monophosphate cyclique.
- GS** : Gélose au sang.
- H** : Heur.
- H<sub>2</sub>S** : Gaz sulfure d'hydrogène.

**Kg/j** : Kilogramme par jour.

**MALDI-TOF** : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight.

**ml** : Millilitre.

**mmol/l** : Mili mole par litre.

**NaCl** : Chlorure de sodium.

**NSP1** : Nonstructural glycoprotein 1.

**NSP4** : Nonstructural glycoprotein 4.

**Na<sup>+</sup>** : Sodium.

**N<sub>2</sub>** : Diazote.

**ODC** : Orthinine décarboxylase.

**OMS** : Organisation mondial de la sante.

**OPNG** : Ortho-nitrophényl-β-galactoside.

**ORL** : Otorhinolaryngologie.

**PCR** : Polymérase Chain réaction.

**PGY** : Bouillon constitué de peptone d'extraits de levure et glucose.

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistante a la méticilline.

**SIDA** : Le VIH virus immunodéficience humaine.

**SMAC** : Gélose Mac Conkey le lactose remplacé par sorbitol.

**SRO** : Solution réhydratation orale.

**SS** : Milieu de culture pour *Salmonella* – *Shigella*.

**TCBS** : Milieu gélose en thiosulfate citrate bile saccharose.

**TDA** : Milieu urée de tryptophane.

**TRO** : Thérapie par réhydratation orale.

**TSC** : milieu Tryptose sulfite cyclosérine.

**VP** : Reaction de Voges-proskauer.

**VP3** : Protéine viral 3.

## **Introduction :**

La diarrhée aiguë est une affection **fréquente**, parfois **grave et urgente chez le nourrisson** et le jeune enfant. La déshydratation aiguë est la principale cause des décès par diarrhées du nourrisson et de l'enfant (*plus de 3 millions d'enfants de moins de 5 ans meurent de diarrhées dans le monde*). Dans les pays développés, elle est aussi responsable d'une morbidité et d'une mortalité non négligeable (*en France, on estime le nombre de décès par déshydratation entre 45 et 80 / an*) [1].

En Algérie, elles sont considérées comme la première cause de mortalité infantile et la 2ème cause de morbidité après les infections respiratoires aiguës.

En 1999 vingt et un mille six cents quatre vingt douze enfants de moins de cinq ans ont été hospitalisés pour diarrhée dont 1374 décéderont par déshydratation.

L'incidence annuelle est de 2.5 épisodes de diarrhée par enfant et par an soit 10 millions de cas. La répartition des cas est saisonnière avec un pic estival, ce qui explique la nécessité de renforcer la lutte chaque été en Algérie [2].

Dans 80 % des cas, les diarrhées aiguës sont dues à des agents infectieux dont les caractéristiques épidémiologiques varient selon les pays. La connaissance de ces agents permet d'améliorer la prise en charge des cas [3].

Les causes les plus fréquentes de diarrhées sont virales et aussi bactériennes ou parasitaire, avec présence fréquente de vomissements (gastro-entérites virales). Le traitement repose sur la **réhydratation par voie orale** et la **réalimentation précoce** qui doivent être parfaitement expliquées aux parents [1].

Ce travail comporte trois grandes parties :

**Le 1er chapitre contient des généralités sur la diarrhée aigue chez le nourrisson**

**Le 2ème chapitre sur les germes causant cette maladie et leur pouvoir pathogènes.**

**Le 3ème chapitre la prévention contre la diarrhée aigue en suivant le contrôle systématique des prélèvements et on termine par conclusion.**

---

# ***CHAPITRE I***

## ***LA DIARRHEES AIGUE***

### ***CHEZ***

## ***LES NOURRISSONS***

---

---

# **CHAPITRE I : LA DIARRHÉES AIGUE CHEZ LES NOURRISSONS**

---

## **1.définition et types des diarrhées :**

Diarrhée du nourrisson : On parle de **diarrhée** du nourrisson si **les selles sont plus liquides et plus fréquentes que d'habitude**. À partir de **plus de trois selles molles ou liquides par jour**, on parle de **diarrhée aiguë**. Une diarrhée chez bébé peut **survenir seule**, ou **s'accompagner de plusieurs troubles** ( ballonnements, vomissements ou encore de maux de ventre) [1].

On définit trois syndromes cliniques de la diarrhée, qui reflètent chacun une pathogénie différente et qui justifient des traitements différents :

- ✓ La diarrhée aqueuse aiguë : diarrhée qui a un début brusque et qui dure moins de 14 jours.
- ✓ La dysenterie : diarrhée s'accompagnant de sang visible dans les selles. Ses causes sont des lésions de la muqueuse intestinale dues à l'envahissement de celle-ci par les bactéries. Les principales conséquences sont une anorexie et un amaigrissement.
- ✓ La diarrhée persistante : diarrhée à début brusque, mais dont la durée est longue (au moins 14 jours) [2].

## **2. Prévalence et épidémiologie :**

L'incidence annuelle des diarrhées aiguës infantiles dans les pays industrialisés est estimée actuellement entre 1,3 à 2,3 épisodes par enfant, les chiffres étant plus élevés chez les enfants séjournant en collectivité. Aux Etats-Unis, plus de 200 000 enfants sont hospitalisés chaque année pour diarrhée aiguë, ce qui représente environ 900 000 journées d'hospitalisation. Les enquêtes publiées montrent que les recommandations thérapeutiques et/ou diététiques largement diffusées concernant l'utilisation des solutions de réhydratation orale (SRO) et les indications très limitées des médicaments sont peu suivies. De nombreuses études confirment que les diarrhées aiguës dans les pays favorisés sur le plan économique sont peu sévères et évoluent favorablement de manière spontanée, cependant le 87 risque de déshydratation est bien réel et est malheureusement encore à l'origine de décès évitables chez le nourrisson en France. Dans les pays en voie de développement l'incidence des diarrhées aiguës infantiles est nettement plus élevée : le nombre d'épisodes variant de 3 à 9 par ans et par enfant. Les maladies diarrhéiques sont encore plus fréquentes et plus sévères dans les parties les plus pauvres des pays en

voie de développement surtout dans les régions tropicales et subtropicales. Un rapport de l'OMS établi en 1992 avançait le chiffre de 3,3 millions de décès par diarrhée aiguë chez des enfants de moins de 5 ans en Afrique, Asie et Amérique latine. Cependant grâce aux campagnes de prévention ce chiffre était nettement inférieur à celui rapporté en 1980 qui faisait état de 4,6 millions de décès dans les mêmes régions. La prévalence des différents agents pathogènes ainsi que leur recrudescence saisonnière est éminemment variable dans les différentes régions du monde, le climat semblant être le facteur le plus important à l'origine de ces variations. La répartition moyenne des fréquences des différents agents infectieux est présentée dans le tableau. Dans les pays nordiques et froids les infections virales prédominent par rapport aux infections bactériennes et sont plus fréquentes pendant la période hivernale, à l'exception remarquable de l'adénovirus qui est plus fréquent en période estivale. Les étiologies bactériennes, à l'inverse, sont plus fréquentes dans les pays chauds et les épidémies sévissent surtout en été et en automne [5].

### **3 . Les symptômes de la diarrhée chez le bébé**

Les selles du nouveau-né sont fréquentes et diffèrent dans leur aspect et leur couleur selon que l'enfant est allaité ou nourri au biberon : en général, un bébé allaité aura des selles "jaune or", granuleuses et plutôt liquides, un bébé nourri au biberon présentera des selles brun clair et plutôt fermes.

Les selles peuvent survenir après chaque repas, d'autant plus si l'enfant est allaité, sans que cela ne soit inquiétant. Des selles occasionnellement molles sont tout à fait normales [6].

On parle toutefois de diarrhées en cas de :

- ✓ Selles malodorantes, striées de glaires et très liquides
- ✓ Selles très fréquentes
- ✓ Fièvre, surtout en cas de gastro-entérite
- ✓ Perte de poids

### **4 .Causes de la diarrhée chez le bébé**

- ✓ Il est nécessaire de différencier les "vraies" diarrhées des "fausses diarrhées :

Les fausses diarrhées qui représentent 90% des cas de diarrhées, sont liées à un événement ponctuel comme une poussée dentaire, une allergie alimentaire, la prise d'antibiotiques, de l'anxiété, un excès d'aliments trop riches. Ces diarrhées, peuvent aussi être la résultante de biberons mal préparés ou être un des symptômes d'une maladie comme une otite, une rhinite ou une bronchite par exemple... Dans ce cas, les

selles sont effectivement de consistance plus liquide, mais la fréquence ne change pas ou peu. Les fausses diarrhées ne doivent pas vous inquiéter : elles disparaissent généralement spontanément avec les autres symptômes.

Les vraies diarrhées (10% des cas) sont dues la plupart du temps à une infection intestinale, beaucoup plus souvent virale que bactérienne. Dans la majorité des cas, c'est le rotavirus qui provoque une gastro-entérite qui abîme les parois de l'intestin et dont les principaux symptômes sont les diarrhées et les vomissements [6].

## **5. Les principaux agents infectieux :**

### **5.1. Les infections virales :**

Représentent la grande majorité des diarrhées aiguës dans les pays développés. Elles sont essentiellement dues au **rotavirus** (en seconde place les adénovirus). Elles évoluent par épidémies automno-hivernales et touchent préférentiellement les nourrissons de 6 mois à 2 ans. Elles surviennent dans un contexte d'infection virale (fébricule, myalgies) et s'accompagnent fréquemment au début de vomissements qui contribuent à la déshydratation. La diarrhée est essentiellement hydrique et fécale et ne dure pas plus de 7 à 10 jours.

Sont en faveur de l'origine virale : la fréquence, le contexte épidémique, la fréquentation d'une collectivité (crèche), l'existence d'un syndrome viral dans les jours précédents, et l'existence de vomissements [1].

### **5.2. Les bactéries entérotoxiques :**

Au premier rang desquelles vient *Escherichia Coli* dans nos climats, agissent en adhérant à la muqueuse intestinale et en sécrétant une entérotoxine qui pénètre la muqueuse et stimule la sécrétion de sodium et donc d'eau. Le choléra est le type le plus grave de diarrhée sécrétoire. Les salmonelles, shigelles peuvent également agir par effet toxinique. La diarrhée est très abondante, aqueuse, dure moins de 5 jours et s'accompagne de douleurs abdominales. Il n'y a habituellement pas de syndrome infectieux.

Sont en faveur : le caractère profus et aqueux, voire afécal, de la diarrhée, en l'absence de syndrome infectieux [1].

### **5.3. Les bactéries invasives :**

Pénètrent et détruisent l'entérocyte, diminuent les possibilités d'absorption intestinale et entraînent une réaction exsudative donnant un aspect glairo-sanglant aux selles. Les bactéries invasives sont essentiellement les *Salmonelles*, *Shigelles*, *Yersinia* et *campylobacter*. La diarrhée peut être modérée mais aussi sévère avec syndrome toxique voire septicémique : douleurs abdominales importantes, fièvre élevée (jusqu'à 40°C), altération de l'état général, voire choc, ténésme, diarrhée contenant du pus et du sang.

Sont en faveur d'une diarrhée à germe invasif : les signes généraux intenses avec syndrome septicémique et diarrhée glairo-sanglante [1].

### **5.4. Les infections parasitaires :**

Sont représentées essentiellement par la lambliaose (ou giardiase), infection cosmopolite, plutôt responsable de diarrhée chronique, et l'amibiase chez l'enfant de retour ou vivant en pays d'endémie [1].

### **5.5. Les infections extradiigestives :**

O.R.L (otite, mastoïdite), broncho-pulmonaires, urinaires, et les méningites peuvent s'accompagner de diarrhée. Chez le nouveau-né la diarrhée est un signe non spécifique d'infection néonatale, et doit faire rechercher une infection systémique. Sont en faveur de l'origine extradiigestive de cette diarrhée : des antécédents néphrologiques, neurologiques ou ORL ou l'existence d'une infection extradiigestive [1].

### **5.6. Les autres causes :**

De diarrhée incluent les diarrhées médicamenteuses (en particulier dues aux antibiotiques) et beaucoup plus rarement congénitales (diarrhée chlorée congénitale).

Les antécédents chirurgicaux (laparotomie), l'existence d'épisodes de douleur abdominale aiguë de début brutal et spontanément résolutifs doivent faire évoquer une **urgence chirurgicale** (invagination, occlusion sur bride, appendicite aiguë) devant un tableau de gastro-entérite avec vomissements et douleurs abdominales importantes [1].

## **6.LES ETIOLOGIES :**

### **6-1/Les virus :**

La présence de virus dans les selles quelle que soit la méthode d'identification utilisée ne suffit pas pour affirmer que tel ou tel agent viral est à l'origine d'une diarrhée aiguë. En effet, des particules virales peuvent être retrouvées en quantité non négligeable chez des enfants sans pathologie digestive. Pour le rotavirus par exemple, une très forte concentration de virus dans les selles (1010 virus par gramme) a été retrouvée chez les sujets malades et la différence était significative par rapport au groupe témoin. Il faudrait pour avoir une certitude étiologique, mettre en évidence une séroconversion à partir de deux prélèvements sanguins à deux semaines d'intervalle [5].

### **Rotavirus :**

Mis en évidence en 1973, les rotavirus sont la cause majeure des entérites chez le nourrisson et l'enfant. Les rotavirus ont un génome constitué de onze segments d'ARN bicaténaire, chacun des brins code pour une protéine structurale ou non. Trois couches protéiques entourent le génome. Les deux couches externes portent les principaux antigènes. Parmi les 14 protéines isolées, les sérotypes liés aux protéines 1, 2, 3, 4, représentent 90 % des souches isolées chez l'homme [11]. Les rotavirus ont un tropisme localisé à l'épithélium des villosités intestinales et dirigé spécifiquement sur les entérocytes matures. Les entérocytes infectés accroissent en taille, se vacuolisent puis desquament. Les particules virales sont incluses dans le réticulum endoplasmique. Ces modifications histologiques apparaissent 24 heures après l'infection et sont maximales entre 24 et 72 heures. Une atrophie minime à modérée associée à une hyperplasie des cryptes a été rapportée. Sur le plan moléculaire il semblerait que ce soit la protéine NSP4 qui augmenterait spécifiquement la concentration de calcium intracellulaire et modifierait les transports membranaires ioniques. Cette protéine agirait en fait comme une véritable toxine en agissant sur la sécrétion d'eau et de chlore par la voie calcium-dépendante [11]. Les facteurs de virulence des rotavirus sont avant tout dépendants de l'hôte : le jeune âge, l'existence d'une malnutrition et les déficits immunitaires sont des facteurs de gravité. Les différences de virulence sont également expliquées par la spécificité des souches virales. La pathogénie des rotavirus ne serait pas liée à un seul gène. Les gènes codant pour les protéines NSP1, NSP4, VP3, VP4 et VP7 interviennent dans la spécificité et la capacité de multiplication du virus [11].

## **Adénovirus :**

Parmi les 47 sérotypes connus d'adénovirus seuls les adénovirus de type entérique correspondant aux sérotypes 40 et 41 sont responsables de diarrhées aiguës chez l'enfant. C'est une des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales en milieu hospitalier se traduisant par une diarrhée aiguë apparaissant chez les enfants hospitalisés pour une autre cause. L'évolution naturelle de cette infection est peu connue cependant elle semble se caractériser par une durée prolongée du syndrome diarrhéique (environ 10 jours) accompagnée de fièvre et, contrairement au rotavirus, peu ou pas de vomissements [11].

## **Astrovirus :**

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'examens fiables, de routine, permettant de connaître la fréquence réelle des diarrhées aiguës à astrovirus chez l'enfant [12]. Cependant les études par immuno-enzymologie utilisant les anticorps monoclonaux et les recherches par microscopie électronique semblent indiquer que la fréquence des infections intestinales à astrovirus chez l'enfant serait bien supérieure à celle estimée [12].

## **Calicivirus :**

Les calicivirus sont des virus à ARN sans enveloppe qui ont été décrits pour la première fois en 1972 au cours d'une épidémie en milieu scolaire à Norwalk dans l'Ohio. Ces virus sont transmis par l'homme, les animaux domestiques ou par contamination de l'eau et des fruits de mer. La diarrhée est très souvent accompagnée de signes ORL ou respiratoires [5].

## **Autres virus :**

De nombreux autres virus ont été identifiés dans les selles mais leur rôle étiologique au cours des diarrhées aiguës infantiles n'a pas toujours été clairement démontré. Les coronavirus représentent une cause très fréquente de diarrhée dans l'espèce bovine ; chez l'homme ils ont été isolés au cours d'épidémies de diarrhées aiguës, retrouvés chez des adultes présentant une sprue tropicale et chez des nouveau-nés souffrant d'entérocolite nécrosante. Les torovirus ont été isolés plus fréquemment chez les enfants diarrhéiques que chez les sujets témoins. Chez les patients immunodéprimés le cytomégalovirus et les picornavirus peuvent être à l'origine d'épisodes de diarrhée aiguë [11].

## 6.2. Les bactéries :

Les agents bactériens responsables de diarrhée varient beaucoup selon la localisation géographique. Les facteurs socio-économiques et les conditions d'hygiène jouent un grand rôle dans la prévalence des infections bactériennes [13].

### *Campylobacter jejuni* :

Cet agent microbien, gram négatif, est très répandu tant dans les pays industrialisés que dans les pays défavorisés. Sa prévalence peut atteindre 10 % des cas de diarrhées aiguës infectieuses, cependant le portage asymptomatique dans les pays pauvres peut concerner, suivant les régions, 40 % des sujets. Ce micro-organisme est capable de produire une entérotoxine qui provoque une diarrhée aqueuse abondante mais aussi de se comporter comme un agent entéro-invasif pénétrant la muqueuse au niveau de l'iléon et du côlon et déclenchant une colite sévère avec syndrome dysentérique, douleurs abdominales violentes et selles sanglantes. Une bonne corrélation peut être établie entre la symptomatologie clinique et les propriétés de virulence du germe (entérotoxino-gène ou entéro-invasif) grâce à des isolements par technique ELISA [5].

### *Salmonelles* :

Plus de 2000 sérotypes de salmonelles ont été répertoriés, cependant *Salmonella typhi* et *Salmonella entéritidis* représentent la majorité des souches isolées dans les pays industrialisés et en particulier en France [11]. Les différentes souches ont en commun leur caractère invasif et leur capacité à sécréter une entérotoxine. La fièvre typhoïde se présente exceptionnellement comme une simple diarrhée aiguë, elle est rare chez le jeune enfant et le problème principal est représenté par les salmonelles non typhoïdiques [12]. La mise en évidence d'une salmonelle à la coproculture chez le nourrisson et le jeune enfant ne doit pas conduire à un traitement antibiotique systématique compte tenu du plus grand nombre d'échecs par rapport à l'adulte et du risque fréquent de portage asymptomatique. Le risque du portage chronique est mal connu, tant pour l'enfant porteur que pour son entourage, malgré tout il est observé plus fréquemment chez l'enfant de moins de 5 ans (50 % après un épisode aigu), que chez l'adulte (15 % environ). Même si les quantités excrétées sont faibles, elles représentent un risque certain de contagion, en particulier chez les enfants vivant en collectivité [5].

### ***Escherichia coli* [12][11]:**

Les colibacilles représentent la population microbienne commensale la plus nombreuse à l'intérieur du tube digestif. Le sérotypage reconnaissant l'antigène O est encore largement utilisé mais il est compliqué à réaliser et peu fiable ; dans l'avenir la biologie moléculaire et les techniques de PCR (Polymérase Chain Réaction) permettront une identification plus précise et une nouvelle classification. Pour l'instant les *Escherichia coli* sont regroupés en fonction de leur mécanisme d'action et des tableaux cliniques qu'ils réalisent.

### ***Escherichia coli enterotoxigènes (ETEC) :***

Les ETEC sont responsables d'un grand nombre de diarrhées bactériennes infantiles dans les pays en développement et de la diarrhée des voyageurs chez l'adulte. Leur pouvoir pathogène est dû à leur capacité d'adhérence et de production d'entérotoxines thermostables et/ou thermolabiles. Certains sérotypes sont souvent à l'origine de diarrhées mais, contrairement aux EPEC, les sérotypes sont plus variés selon les pays. L'identification précise repose sur la mise en évidence des facteurs d'adhérence aux cellules épithéliales, très caractéristiques des ETEC, et sur l'identification de la toxine.

### ***Escherichia coli entéropathogènes (EPEC) :***

Les EPEC furent les premiers à être identifiés dans les années 50. Les sérotypes O55 et O111 étant les plus fréquemment isolés. Actuellement ces souches sont plus largement retrouvées dans les pays en développement. Une toxine n'a jamais pu être identifiée pour ce groupe, mais ces *Escherichia coli* se caractérisent par des capacités d'adhésion très fortes sur la bordure en brosse des entérocytes.

### ***Escherichia coli entéro-invasifs (EIEC) :***

Ces micro-organismes partagent bien des caractères : biologiques, morphologiques et fonctionnels avec les shigelles. Ils déclenchent un syndrome dysentérique fébrile particulièrement sévère. Leur isolement repose sur la positivité du test de Sereny (keratoconjunctivite provoquée chez le cobaye). Une entérotoxine (30 à 100 kDa) vient d'être récemment isolée.

### ***Escherichia coli entéro-hémorragique (EHEC) :***

Les EHEC représentent également un groupe récemment identifié depuis que le sérotype O157 : H7 a été démontré comme responsable d'épidémies de colites hémorragiques. La survenue de syndromes hémolytiques et urémiques est notée chez environ 10 % des enfants présentant une infection à *Escherichia coli* O157 : H7. Cette complication peut survenir même en l'absence de diarrhée glairo-sanglante. Il convient donc de rechercher ce germe par sérotypage devant toute atteinte de la fonction rénale pour pouvoir débiter un traitement précoce. La toxine peut être recherchée dans les selles par étude de cytoxicité sur des cellules Véro en culture ou par PCR.

### ***Escherichia coli entéro-agrégant (EA-AggEC) :***

Ce groupe de germes semble être à l'origine de diarrhées prolongées chez le nourrisson et le jeune enfant. Ils semblent très proches des EPEC mais pour l'instant aucun sérotype n'a pu être défini et aucune toxine n'a été isolée.

### ***Shigelles* [12] [11]:**

Les shigelloses ne sévissent pas uniquement dans les pays en développement. Elles sont à l'origine de nombreuses diarrhées dans les pays développés et touchent avant tout l'enfant. La mortalité, très élevée dans les pays pauvres n'est pas exceptionnelle en Occident. Les shigelles sont des bactéries gram négatif sans capsides externe. On décrit 40 sérotypes appartenant à quatre sérogroupes :

- ✓ groupe A, *Shigella dysenteriae*
- ✓ groupe B, *Shigella flexneri*
- ✓ groupe C, *Shigella boydii*
- ✓ groupe D, *Shigella sonnei*

Les souches à l'origine des formes les plus graves, entraînant une mortalité élevée, sont *S. dysenteriae* (en particulier de sérotype 1) et *S. flexneri*. Les shigelles envahissent l'épithélium colique et déterminent une réaction inflammatoire et des ulcérations, mais sont également à l'origine d'une diarrhée sécrétoire par l'intermédiaire d'une entérotoxine [13]. Les shigelloses sont une des causes de diarrhées bactériennes les plus transmissibles. L'inoculum nécessaire est très faible (dix bacilles engendrent des symptômes chez 10 % des volontaires) ; la survenue d'épidémies intra-familiales ou dans les collectivités autour du cas initial sont très

fréquentes. Le tableau est très polymorphe. Il peut s'agir d'une diarrhée modérée guérissant spontanément ou, au contraire, d'un syndrome dysentérique avec choc et manifestations neurologiques. Les convulsions sont très fréquentes et la règle est de pratiquer une coproculture chez un enfant fébrile et diarrhéique qui a des convulsions. Toutes les souches de shigelles sécrètent, à des degrés divers, une toxine dite Shiga-toxine, très cytotoxique, ou Vérotoxine. Les souches de *S. dysenteriae* de sérotype 1 en sécrètent de mille à dix mille fois plus que les autres espèces [5].

### ***Yersinia enterocolitica* :**

Il s'agit d'un agent pathogène, invasif pour la muqueuse de l'intestin grêle au sein de laquelle il entraîne des lésions de la bordure en brosse et des altérations des fonctions de transport pouvant conduire à une malabsorption de certains nutriments. Il pourrait également sécréter une toxine. Ce germe est à l'origine de diarrhées d'évolution prolongée (1 à 2 semaines). [5] L'infection s'accompagne de fièvre et de douleurs abdominales. Chez certains sujets l'infection à *Yersinia* peut entraîner une adénite mésentérique et un tableau clinique qui ressemble aux maladies inflammatoires chroniques intestinales [11].

### ***Vibrion cholérique* :**

*Vibrio cholerae* est un micro-organisme mobile, aquatique à l'origine d'épidémies spectaculaires mais qui subsiste à l'état pandémique dans de nombreuses régions du globe. Il possède l'antigène 01 qui peut être reconnu par anticorps monoclonal ou polyclonal. Les deux principaux sérotypes sont Inaba et Ogawa. La diarrhée profuse induite par les vibrions cholériques est le prototype du mécanisme dû à une entérotoxine [11].

Toutes les souches sauvages de *Vibrio cholerae* produisent une protéine binaire de 84000 Da. Elle est dix fois plus puissante que celle de l'ETEC ; elle se combine avec un récepteur spécifique GM1 situé dans la bordure en brosse, la partie active pénètre la cellule par endocytose et en moins de 15 minutes, par une action enzymatique elle active de façon irréversible l'adényl cyclase et l'AMP cyclique ce qui a pour conséquence une hypersécrétion d'eau et de chlore dans la lumière. Une autre toxine est sécrétée, dénommée Zona Occludens Toxin (ZOT), qui augmente la perméabilité intestinale par atteinte des jonctions serrées inter-entérocytaires [5].

### ***Clostridium difficile* :**

Le rôle de *clostridium difficile* dans les diarrhées associées aux antibiotiques est parfaitement établi, ainsi que dans la forme majeure représentée par la colite pseudomembraneuse, au demeurant peu fréquente chez l'enfant. Il semblerait que ce germe puisse également être à l'origine de diarrhées aiguës sporadiques chez des enfants n'ayant pas reçu d'antibiotiques [12].

### **Autres agents bactériens :**

*Klebsiella pneumoniae* : est apte à sécréter une toxine thermostable qui provoque une diarrhée sécrétoire chez certains enfants présentant une malnutrition. *Citrobacter freundii* possède des analogies avec les ETEC [14], plus particulièrement une entérotoxine similaire à la toxine STa. *Plesiomonas shigelloides* n'a été décrit que dans les régions asiatiques (Japon, Thaïlande) et contaminerait essentiellement les poissons et fruits de mer [5].

### **6.3. Les parasites :**

Même dans les zones de très forte endémie, les parasites digestifs sont loin de représenter une cause majeure des diarrhées de l'enfant. C'est encore plus vrai en France où les parasites digestifs sont peu fréquents [12].

### ***Giardia intestinalis Giardia lamblia* :**

Est un des parasites intestinaux les plus largement répandu, pouvant affecter l'être humain à tous les âges. L'infection s'acquiert par voie oro-fécale à partir d'eau contaminée, aliments, mains insuffisamment lavées ou par contact intrafamilial ou chez les nourrissons vivant en collectivité [14]. Les manifestations cliniques de l'infection à *Giardia* peuvent varier du portage asymptomatique jusqu'au tableau de malabsorption chronique sévère. L'infestation massive et aiguë à *Giardia* peut donner des épisodes brutaux de diarrhée aiguë mais aussi des épisodes de selles liquides plus marqués sur un fond de diarrhée chronique. Il est cependant difficile dans les régions d'endémie d'affirmer que la présence du parasite dans les selles puisse être à l'origine d'un épisode précis de diarrhée aiguë. Par ailleurs, le germe peut être retrouvé à la biopsie intestinale, par étude des sécrétions duodéno-jéjunales par technique d'immunofluorescence et ne pas être identifié au même moment dans les selles même par des techniques performantes [15].

## ***Cryptosporidies* :**

*Cryptosporidium* est un protozoaire de petite taille initialement décrit comme agent pathogène chez les animaux. Il se localise puis se multiplie au niveau de la bordure en brosse des entérocytes où il peut produire des altérations structurales très importantes. Sa présence peut être révélée en microscopie optique après coloration de Ziehl-Neelsen, en microscopie électronique ou par marquage par des anticorps monoclonaux. Chez l'homme, son rôle pathogène a d'abord été mis en évidence chez les sujets immunodéprimés ; les épisodes de diarrhées aiguës à répétition chez les enfants présentant un déficit immunitaire avec atrophie villositaire ou infectés par le virus du SIDA étant fréquemment due à une colonisation du tube digestif par des cryptosporidies, ces données justifiant même la pratique de cure de désinfection systématique par antibiotiques dérivés de la spiramycine chez ces patients. Ce parasite a depuis été décrit comme une cause de diarrhée aiguë chez le sujet immunocompétent, mais une plus grande fréquence et surtout un risque de dissémination rapide a été rapporté au sein de populations d'enfants souffrant de malnutrition [11] [13].

## **Autres parasites :**

Dans les régions tropicales, et à un degré bien moindre dans les pays tempérés, certains parasites peuvent être à l'origine d'authentiques poussées de diarrhées aiguës. L'amibiase due à *Entamoeba histolytica* est également redoutée: la dysenterie et l'émission douloureuse de selles sanglantes et afécales sont très évocatrices. Le tableau peut être beaucoup plus banal, fait d'une simple diarrhée aiguë. Le métronidazole doit être prescrit à doses élevées (25 mg/kg/j) pendant au moins 7 jours [13].

Parmi les protozoaires autre que les cryptosporidies, peuvent être cités : *entamoeba histolytica*, *balantidium coli*, *isospira belli* et *cyclospora*. Par ailleurs, les infections dues aux nématodes ne peuvent en principe pas engendrer de perturbations des mécanismes de sécrétions et d'absorption de l'eau et des électrolytes mais ils peuvent en colonisant l'intestin créer des phénomènes inflammatoires de la muqueuse, gêner la déconjugaison des sels biliaires et favoriser la malabsorption de certains nutriments qui se traduisent par une augmentation et une accélération du débit fécal. Ces troubles de transit plus ou moins aigus ont été décrits en présence d'*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *necator americanus* ou de formes adultes d'ankylostomes [11].

**Tableau 1** : principaux agents responsables de diarrhées aiguës infectieuses [5].

	agents	Fréquence(%)
Bactéries	<ul style="list-style-type: none"><li>- Campylobacter jejuni</li><li>- Escherichia coli</li><li>- Salmonelles</li><li>- Shigelles</li><li>- Yersinia enterocolitica</li><li>- Vibron cholérique</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 6-8</li><li>- 2-5</li><li>- 3-7</li><li>- 1-3</li><li>- 1-2</li><li>- 0-2</li><li>- ?</li></ul>
Virus	<ul style="list-style-type: none"><li>- Rotavirus</li><li>- Adénovirus</li><li>- Calicivirus</li><li>- Astrovirus</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 30-60</li><li>- 2-4</li><li>- ?</li><li>- ?</li></ul>
Parasites	<ul style="list-style-type: none"><li>- Giardia intestinalis</li><li>- Cryptosporidies</li><li>- Entamoeba histolytica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- 1-2</li><li>- 0-2</li><li>- ?</li></ul>

-Ce tableau représente la fréquence des agents responsables plus abondants chez les nourrissons diarrhéiques.

## **7. Physiopathologie:**

### **7.1. Mécanismes cellulaires et moléculaires**

#### **Physiologie cellulaire :**

La survenue d'une diarrhée résulte d'interactions complexes entre l'agent pathogène et les cellules intestinales de l'hôte. Ces échanges entre l'agent extérieur et la cellule eucaryote procèdent d'une véritable communication, d'un langage, qui s'établit entre des récepteurs effecteurs cellulaires et des zones de contact du micro-organisme infectant ou des molécules secrétées par celui-ci.

#### **Barrière intestinale et zones de passage et d'échanges :**

L'épithélium intestinal a une structure polarisée qui lui permet de fonctionner comme une barrière séparant deux milieux mais également de transporter des molécules ou des fluides d'un compartiment à l'autre. La continuité de la barrière est

assurée par des rapprochements entre les cellules qui sont aussi des lieux de passage figurés par les complexes jonctionnels, ou jonctions serrées (encore appelées zona occludens). Cette zone est située à la partie la plus apicale de deux entérocytes comprenant de bas en haut : la jonction serrée proprement dite, puis une section intermédiaire contenant un filament d'actine-myosine et enfin le desmosome. Ces régions sont des lieux de passage parfaitement contrôlés : l'étanchéité de la muqueuse est en outre renforcée par un épais tapis de mucus (glyocalyx) qui recouvre les entérocytes. Malgré tout, cette barrière présente des points faibles où le tapis muqueux s'interrompt représentés par les structures lymphoïdes : plaque de Peyer et nodules solitaires. Ces zones contiennent des cellules M dont le rôle est d'assurer l'entrée de particules pour faciliter leur présentation aux cellules immunocompétentes. Ce sont ces " pores " qu'utiliseront préférentiellement certains pathogènes pour franchir la barrière épithéliale [5].

### **Voies de contrôle de la sécrétion et de la perméabilité de l'entérocyte :**

Les phénomènes de contrôle de l'absorption et de la sécrétion d'eau et d'électrolytes sont régulés par 4 mécanismes sous la dépendance de 4 effecteurs principaux : l'AMP cyclique, la GMP cyclique, le calcium intracellulaire et les protéines du cytosquelette. Les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) peuvent stimuler la sécrétion entérocytaire par trois effets : ils activent le canal principal à chlorure CFTR (cystic fibrosis Trans-membrane conductance regulator), ils augmentent la production de calcium intracellulaire, enfin ils agissent sur les jonctions serrées et sur les protéines du cytosquelette. Le calcium intracellulaire par son élévation stimule les protéines transporteuses d'ions et la sécrétion, active le CFTR et module la perméabilité intestinale par action sur les jonctions serrées.

Les protéines du cytosquelette assurent la rigidité du cytoplasme par des microfilaments (kératine et actine) et l'amarrage au niveau des jonctions serrées. C'est le maintien de la structure cylindrique des entérocytes et leur polarité qui est le garant du fonctionnement normal des autres mécanismes [5].

### **Facteurs moléculaires de virulence des agents pathogènes :**

Les agents pathogènes disposent d'une ou plusieurs propriétés leur permettant de " dialoguer " avec les cellules intestinales et de troubler leur mécanisme, ou plus radicalement d'envahir et de forcer la barrière muqueuse. Ces capacités sont au nombre de 4 : adhésion, multiplication (colonisation), sécrétion de toxine(s) et invasion.

Ces différentes aptitudes sont codées par des déterminants antigéniques qui sont eux-mêmes transférables par conjugaison, transduction ou transposition.

La capacité d'adhésion d'une bactérie est liée à des microfibrilles (frimbriae) portées comme une chevelure ou une touffe de poils ou à la présence d'un flagelle. Le contact avec la cellule induit la production de ligands bactériens qui sont des adhésines favorisant l'attachement. L'aptitude à sécréter des toxines est très répandue chez les agents pathogènes. Elles sont regroupées en 4 classes principales : les entérotoxines, les toxines altérant le cytosquelette (ZOT par exemple), les cytotoxines et les toxines à tropisme nerveux. La capacité d'invasion est liée essentiellement à l'utilisation de la cellule M comme porte d'entrée. Une fois franchie la barrière muqueuse, les agents bactériens procèdent de deux manières différentes :

- ✓ Certains restent localisés au sein de la muqueuse intestinale (*campylobacter jejuni*, *shigelles*, EIEC)
- ✓ D'autres comme les salmonelles ou *yersinia entérocolitica* utilisent les cellules phagocytaires ou dendritiques pour se répandre et essaimer à distance [5].

## **7.2 .Conséquences physiopathologiques :**

L'équilibre entre les phénomènes d'absorption et de sécrétion électrolytique conditionne et caractérise le cycle entéro-systémique de l'eau. Toute diarrhée aiguë est liée à une anomalie de ce cycle entéro-systémique, par dérèglement des processus d'absorption ou de sécrétion des électrolytes, essentiellement du sodium. La conséquence univoque de ces troubles de la sécrétion ou de l'absorption hydroélectrolytique est une perte anormale d'eau et d'électrolytes par les selles, à l'origine d'une déplétion hydroélectrolytique.

Dans notre pays quelle que soit l'étiologie en cause, les concentrations moyennes fécales sont sodium : 25 à 75 mmol/l, potassium : 30 à 75 mmol/l et chlore : 10 à 40 mmol/l.

Cette déperdition hydroélectrolytique est généralement à l'origine d'une déshydratation de type hyponatrémique. La perte fécale de potassium, à l'origine d'une baisse du potassium extracellulaire entraîne un hyperaldostéronisme qui augmente la déplétion potassique par hyperkaliurie, l'hypokaliémie qui en résulte pouvant elle-même être à l'origine d'un iléus paralytique qui aggrave les pertes électrolytiques fécales. Plus rarement, la conséquence de ces déperditions hydroélectrolytiques est une déshydratation de type hypernatrémique qui s'observe

particulièrement dans les diarrhées aiguës très sévères et lorsque l'enfant a une alimentation hyper-osmolaire, trop riche en sel ou en hydrates de carbone. L'utilisation de formules lactées à charge osmolaire réduite a permis de diminuer considérablement ce risque de déshydratation hypernatrémique.

Toute diarrhée aiguë peut être par ailleurs à l'origine de troubles de la digestion et de l'absorption de certains nutriments. Des lésions épithéliales et une atrophie villositaire modérée ont surtout été démontrées au cours des infections à rotavirus.

Elles sont à l'origine d'une diminution des activités disaccharidiques. Les troubles de la motricité intestinale peuvent également diminuer les capacités d'absorption des hydrates de carbone. La survenue d'un déficit en lactase et d'une intolérance secondaire en lactose ont pendant longtemps été considérés comme des complications fréquentes des diarrhées aiguës et ont été à l'origine de la mise en œuvre de régime spéciaux ou de protocoles de réintroduction très progressive du lait. Si le déficit en lactase secondaire à l'atrophie villositaire qui accompagne la malnutrition reste une complication fréquente et redoutable dans les pays pauvres chez un enfant qui va présenter en plus une diarrhée aiguë, l'intolérance au lactose au cours des diarrhées aiguës habituellement rencontrée dans les pays développés est devenue exceptionnelle. Une étude récente menée sous l'égide de la Société Européenne (ESPGHAN) chez 230 enfants dans 12 centres hospitaliers en Europe confirme cette notion et conduit cette Société à ne plus recommander l'utilisation des laits sans lactose et à préconiser une renutrition très précoce au cours de tout épisode de diarrhée aiguë.

Une autre complication a également conduit à la prescription de régime spéciaux plus particulièrement chez le jeune nourrisson : il s'agit du risque de sensibilisation aux protéines du lait de vache. Cette entité a été un temps dénommée " syndrome post-entérique " et semblait plus spécifiquement liée à l'infection à rotavirus.

En fait cette complication paraît peu fréquente et fait discuter l'utilisation systématique d'hydrolysats de protéines, en des formules partiellement hydrolysées chez les nourrissons de moins de 4 mois présentant un épisode diarrhéique. Seule une évolution supérieure à une semaine justifie, chez les très jeunes enfants, l'utilisation de formule es extensivement hydrolysées [5].

## **8.Aspects cliniques :**

La diarrhée aiguë est généralement définie par une modification de la consistance des selles (plus molles ou liquides) et/ou par une majoration de la fréquence des exonérations (supérieure ou égale à 3 selles par 24 heures), avec ou sans fièvre ou vomissements. En général, la diarrhée dure moins de 7 jours et jamais plus de 14 jours. Cependant, un changement dans la consistance des selles par rapport à la consistance antérieure est plus significatif d'une diarrhée que le nombre de selles, en particulier au cours des premiers mois de vie [16] [17]. En fonction des principaux symptômes 3 entités cliniques peuvent être réalisées (Tableau 2).

### **8.1.Entérite virale**

Ce sont les diarrhées les plus fréquentes chez l'enfant avant 18 mois. Les infections digestives virales touchent essentiellement l'intestin grêle et se manifestent par un tableau d'entérite aiguë. L'atteinte isolée du côlon est peu fréquente, par contre chez le nouveau-né, l'atteinte est souvent diffuse se traduisant par une entérocolite. Les vomissements sont fréquents et intenses; ils sont le plus souvent dus à un état de cétose.

La période d'incubation varie selon le type de virus: de 18 à 48 heures pour les calicivirus, de 2 à 4 jours pour les rotavirus et les astrovirus et de 3 à 10 jours pour les adénovirus.

Les symptômes se caractérisent par des selles liquides aqueuses souvent associées à des vomissements. La phase aiguë est parfois précédée ou accompagnée de signes ORL (rhinopharyngite, otite) ou respiratoires. Dans la majorité des cas, les signes régressent en quelques jours, mais une déshydratation aiguë peut compliquer le tableau clinique [11] [18] [19].

### **8.2.Diarrhée invasive bactérienne**

Un mécanisme «invasif» est suspecté devant un tableau dysentérique. Les germes invasifs déclenchent un tableau clinique assez caractéristique fait d'une fièvre élevée, de douleurs et de crampes abdominales, de ténésme (contractions douloureuses du sphincter anal), de faux besoins associés à des selles sanglantes, purulentes ou glaira-sanglantes. Les vomissements sont absents mais le risque de déshydratation n'est pas négligeable. Les selles sont précédées, accompagnées et suivies pendant quelques minutes de crampes abdominales et d'épreintes

(contractions douloureuses du côlon terminal) parfois particulièrement pénibles; si l'atteinte colique est intense, le tableau diarrhéique et douloureux peut prédominer en période nocturne. Les causes habituelles sont les salmonelles mineures, les shigelles, *Campylobacter*, *Yersinia*, les colibacilles entéro-invasifs et entéro-hémorragiques (et quelques parasites) [11] [18].

### **8.3. Diarrhée par production de toxine**

Les différentes toxines agissent par des mécanismes différents cependant elles réalisent sur le plan clinique un tableau assez univoque marqué par un début très brutal, des selles profuses et un météorisme abdominal.

Il n'y a pas de douleurs abdominales et peu ou pas de fièvre. Ces diarrhées peuvent prendre un caractère sécrétoire très marqué (choléra) et la réhydratation doit être menée de façon précoce parallèlement au débit fécal.

Les aspects cliniques des diarrhées aiguës infantiles peuvent également être classifiés en fonction de l'état de déshydratation apprécié sur le pourcentage de perte de poids ou estimé en fonction de critères cliniques.

✓ **Diarrhée aiguë bénigne** : il n'y a pas de signes cliniques de déshydratation, la perte de poids est nulle ou inférieure à 5 % du poids du corps, l'enfant n'a pas de vomissements ni de météorisme abdominal.

✓ **Diarrhée aiguë d'intensité moyenne** : les signes de déshydratation sont nets (soif, persistance du pli cutané, perte de poids entre 5 et 8 % du poids du corps), associés à de la fièvre, à une anorexie, à des vomissements, à une diarrhée importante.

✓ **Diarrhée grave** : la diarrhée est profuse, l'intolérance gastrique absolue, les signes de déshydratation marqués (soif, " faciès toxique ", état de choc, polypnée témoignant de l'existence d'une acidose, persistance du pli cutané, sécheresse des muqueuses, oligoanurie, parfois troubles de la conscience) ; le météorisme abdominal est net. La perte de poids dépasse 10 % du poids du corps [5].

**Tableau 2** : Principaux symptômes observés en fonction du mécanisme et de l'étiologie des diarrhées aiguës [5].

	Entérite virale	Diarrhée par production de toxine	Diarrhée invasive
Fièvre	+	+	+++
Déshydratation	+++	++	+
Choc	+	-	-
Vomissements	+++	+	+
Selles aqueuses	+++	-	-
Leucocytes fécaux	+	-	+++

## **9. Diagnostic**

### **9.1. Analyse sémiologique de la diarrhée**

#### **9.1.1. Caractères des selles** : Il faut préciser :

- La date de début.
- Les caractéristiques des selles :
  - ✓ **Leur nombre, le volume, la consistance** : allant de selles molles à des selles liquides profuses (syndrome dysentérique dans les mécanismes entérotoxiques hypersécrétoires)
  - ✓ **Leur aspect** : fécal, aqueux (entérotoxique hypersécrétoire)
  - ✓ **La présence de sang**, de glaires, de pus (processus entéroinvasif) [7].

#### **9.1.2. Signes associés** Il faut préciser l'existence et l'ancienneté de signes associés :

- Vomissements
- Refus de boire

- Fièvre élevée Et préciser les mesures diététiques et/ou thérapeutiques déjà mises en route (ou non) en particulier l'arrêt de l'alimentation lactée, ainsi que toute prise médicamenteuse [7].

## 9.2. Recherche de signes de gravité

### 9.2.1. Gravité de la déshydratation

**Rappels** : Évaluation de la perte de poids = poids antérieur récent - Poids actuel / Poids antérieur.

- Perte de poids < 5 % : déshydratation modérée.
- Perte entre 5 et 10 % : apparition des signes cliniques de déshydratation :
  - ✓ extracellulaire : persistance anormale du pli cutané, hypotonie des globes oculaires, dépression de la fontanelle.
  - ✓ Intracellulaire : soif vive, sécheresse muqueuse, fièvre.
  - ✓ Perte > 10 % : déshydratation grave :

o **signes précédents et collapsus périphérique** : allongement du temps de recoloration cutanée, extrémités froides, tachycardie

o **puis collapsus central** : chute de la tension artérielle

o troubles de la conscience allant jusqu'au coma [7].

### 9.2.2. Autres signes de gravité

- Nourrisson de moins de 6 mois
- Dénutrition associée (diarrhée aiguë sur terrain digestif chronique) [7].

## 9.3. Recherche étiologique

Les étiologies sont dominées par les Gastro-entérites aiguës d'origine infectieuse

L'identification du micro-organisme causal n'est le plus souvent pas indispensable, puisqu'il s'agit le plus souvent de virus, dont la guérison est

spontanée. La recherche virologique a surtout un intérêt épidémiologique et doit être pratiquée essentiellement en phase épidémique.

En ce qui concerne les diarrhées d'origine bactériennes, il faut retenir comme indication d'examen bactériologique des selles (coproculture) :

- ✓ Une diarrhée sanglante ou purulente
- ✓ Une diarrhée rebelle
- ✓ Un contexte épidémique

Les infections extra-digestives ont fréquemment des manifestations digestives en particulier une diarrhée chez le nourrisson :

- ✓ Otite
- ✓ Pneumopathie
- ✓ Pyélonéphrite.....

**Les causes non infectieuses de diarrhée :**

- ✓ Syndrome Hémolytique et Urémique (ou la diarrhée peut précéder l'hémolyse et l'insuffisance rénale aiguë)
- ✓ Intolérance Protéines du Lait de Vache [7].

10. les particularités de la déshydratation chez l'enfant :

La déshydratation aiguë est définie par un déficit hydro électrolytique corporel d'installation rapide.

Plusieurs particularités physiologiques permettent de comprendre la fréquence et la gravité accrues des déshydratations chez le nourrisson, le retentissement rapide sur le secteur extracellulaire et notamment vasculaire, avec le risque de choc hypovolémique.

- Le contenu et la répartition de l'eau varie avec l'âge : plus l'enfant est jeune, plus il est constitué d'eau et plus cette eau se situe dans les secteurs extra-cellulaires. Un nouveau-né est constitué de 80 % d'eau (45 % extracellulaire et 35 % intracellulaire). Vers un an, le nourrisson est constitué de 70 % d'eau (25 % extracellulaire et 45 % intracellulaire).

- Le nourrisson a un cycle de remplacement hydrique beaucoup plus rapide en raison notamment d'un métabolisme basal plus élevé, et de pertes cutanées plus

importantes. A la naissance, 25 % de l'eau est recyclée par jour alors que ce chiffre est de 6 % chez l'adulte. Les besoins hydriques journaliers rapportés au poids sont ainsi plus importants chez le nourrisson (tableau 3).

- Le pouvoir de concentration urinaire est moindre au cours des premiers mois de vie.
- Les nourrissons dépendent de leurs parents pour leurs apports hydriques et l'expression de leur soif est plus difficile à percevoir.

**Tableau 3** : Besoins hydrosodés et volume sanguin selon l'âge(1)  
(1 gramme de NaCl contient 17 mEq de Na<sup>+</sup>)

	Nouveau-ne	Nnourisso n	Petit enfant	Grand enfant	
	3kg	→ 10 kg	→ 20kg	→ 70 kg	
Besoins hydriques journaliers	100 ml /kg		+50ml/kg	+20ml/kg	
Ex : enfant de 29 kg	100*10ml		+(50*10)	+(20*9)=	1680ml
Besoins sodés journaliers	2 à 3mEqNa <sup>+</sup> /kg				
Volume sanguins	80ml/kg	75ml/kg	65ml/kg	46-50ml/kg	

Rappels physiologiques sur les mouvements transmembranaires de l'eau et classification des déshydratations :

Les membranes cellulaires sont perméables à l'eau et à certains solutés seulement. Le passage d'eau à travers ces membranes dépend de la concentration des substances dissoutes non diffusibles (responsables de la pression osmotique) de part et d'autre de ces membranes, l'eau allant vers le milieu le plus osmolaire.

Dans les déshydratations aiguës par gastro-entérites, la connaissance de la natrémie (qui reflète le plus souvent bien l'osmolarité extra-cellulaire) permet de classer les différents types de déshydratations.

1. Le déficit en eau et en sel sont proportionnels : la déshydratation est globale, isonatémique, iso-osmolaire.

2. Le déficit en sel est proportionnellement supérieur au déficit en eau : il s'agit d'une déshydratation à prédominance extracellulaire, hyponatrémique, hypo-osmolaire.

3. Le déficit en eau est proportionnellement supérieur au déficit en sel : il s'agit d'une déshydratation à prédominance intracellulaire, hypernatrémique, hyperosmolaire (moins de 5% des déshydratations du nourrisson) [1].

## **11 . les signes cliniques propres à la déshydratation extra-intra cellulaire :**

### **11.1. Etat de choc par hypovolémie (déshydratation importante du secteur vasculaire)**

\* Les signes cliniques les plus précoces chez le nourrisson sont :

- ✓ la tachycardie,
- ✓ la polypnée,
- ✓ les signes de vasoconstriction cutanée (teint gris, extrémités froides et cyanosées, marbrures cutanées et allongement du temps de recoloration cutanée),
- ✓ l'état d'agitation qui précède l'altération de la conscience.

\* Les valeurs des fréquences cardiaques et respiratoires doivent être interprétées en l'absence de pleurs, et selon la température. L'hypotension artérielle est un signe tardif de choc chez le nourrisson en raison de l'importance de la vasoconstriction (réponse adrénargique de stress) qui permet longtemps le maintien de la pression artérielle. La persistance de l'état de choc aboutit à un tableau de défaillance multiviscérale pouvant évoluer ensuite malgré la correction secondaire du choc [1].

### **11 .2. Le diagnostic de déshydratation aiguë est clinique**

On distingue des signes de déshydratation globale (perte de poids), extracellulaire et intracellulaire (tableau 4). Le critère « étalon » pour le diagnostic de déshydratation aiguë est en théorie la perte de poids, reflet le plus fiable de la déshydratation et de son importance. Malheureusement dans la pratique courante, elle n'est qu'exceptionnellement évaluable de façon fiable puisqu'il convient de disposer d'un poids très récent (le nourrisson grossit rapidement) mesuré si possible sur la

même balance de précision (imprécision de mesure d'une balance à l'autre). De plus, en cas d'affection chirurgicale avec constitution d'un troisième secteur, il peut exister des signes de déshydratation et de choc hypovolémique sans perte de poids.

Le diagnostic de déshydratation nécessite l'association de plusieurs signes cliniques, la sensibilité et la spécificité de chacun étant médiocre. Les premiers signes cliniques de déshydratation apparaissent pour une perte de poids d'environ 3 %. Ces signes et la tolérance de la déshydratation dépendent aussi de la rapidité d'installation du déficit hydrosodé. Les principaux signes de déshydratation sont reportés dans le tableau II. Le nombre de signes présents augmente avec l'importance de la déshydratation. La présence de trois ou plus de ces signes représente le meilleur compromis pour la prédiction d'une déshydratation  $\geq 5\%$  [1]

**Tableau 4** : Signes cliniques de déshydratation [1].

Extracellulaire	Intracellulaire
Cernes oculaire Pli cutané persistant Fontanelle déprimée Absence de larmes lors des pleurs	Muqueuses sèches et soif Hypotonie des globes oculaires Fièvres Troubles de conscience
Tachycardie Polypnée Marbrures ; temps de recoloration cutané allongé Tardifs : hypotension artérielle et oligurie	

# **CHAPITRE**

## **II**

**LES AGENTS RESPONSABLE À LA**

**DIARRHÉE AIGUE**

**ET**

**LEUR CARACTÉRISTIQUES**

## **CHAPITRE II : LES AGENTS RESPONSABLE À LA DIARRHÉE AIGUE ET LEUR CARACTÉRISTIQUES (LES BACTÉRIES) :**

Les agents bactériens responsables de diarrhée varient beaucoup selon la localisation géographique. Les facteurs socio-économiques et les conditions d'hygiène jouent un grand rôle dans la prévalence des infections bactériennes [8].

### **1-Caractéristiques de *Clostridium difficile* [9]:**

#### **Habitat :**

Elle est présente dans l'environnement naturel, l'intestin de l'homme ainsi que celui de nombreuses espèces animales.

-Chez l'homme, le taux de colonisation varie selon l'âge : (20 à 70) % des enfants sains de moins de 1 an.

-Ainsi, on le retrouve dans l'environnement des malades (sols des chambres des hôpitaux, vêtements, poignées des portes, les robinets, les toilettes).

#### **Caractères bactériologique :**

- *Clostridium difficile* est un bacille à gram positif, anaérobie strict, donnant les spores ovales sub terminales déformantes.

- mobile grâce à une ciliature péritriche.

- Chez quelques souches, des fimbriae on capsule ont été mis en évidence, mais leurs rôles dans la pathogénicité restent discutés.

#### **Caractères cultureux**

- L'incubation se fait à 37 °C en atmosphère anaérobie.

- Dans un bouillon constitué de peptone d'extraits de levure et du glucose (bouillon PGY ou TGY) un trouble homogène est obtenu en 24 heures avec un sédiment abondant.

- Sur gélose au sang, les colonies sont circulaires, plates ou légèrement bombées, opaques, grisâtre, ou blanchâtres sans zones d'hémolyse [20].

### **caractères biochimiques**

-Métabolisme protéique : pas déshydrations du lait, hydrolyse de la gélatine.

-Nitrate réductase (-), uréase (-). -Métabolisme glucidique : fermentation du glucose, du fructose, du mannitol, et du mannose .

### **Pouvoir pathogène**

-*Clostridium difficile* est responsable des diarrhées se manifestant après une antibiothérapie (diarrhées post-antibiothérapie ) [21].

## **2-Characteristiques de *Campylobacter jejuni***

### **Habitat**

-*Campylobacter jejuni* sont des germes pathogènes dont on note la présence dans les intestins et de l'homme. L'eau peut être un vecteur de contamination.

### **Caractères bactériologique :**

-*C. jejuni* est un bacille à Gram négatif, fin, incurvé et de forme spiralée ; Cette bactérie présente généralement une ondulation qui lui donne un aspect en virgule ou en « S » et quelquefois en hélice pour les plus longues

-Elle est asporulée et possède un ou deux flagelles polaires de taille variable

-Ils lui confèrent une grande mobilité

-qui est importante dans le phénomène de colonisation du tractus intestinal. La présence d'une capsule a été démontrée, celle-ci aurait des conséquences sur la virulence et la variabilité antigénique de *C. jejuni*

### **Caractères cultureux :**

-*Campylobacter jejuni* peut être cultivé sur un milieu sélectif particulier "CAMP" à 42 °C

- *Campylobacter jejuni* préfère les conditions microaérophiles (elle privilégie les atmosphères pauvres en dioxygène) et capnophile, nécessitant une atmosphère de croissance aux proportions suivantes : 5 % O<sub>2</sub> (dioxygène), 10 % CO<sub>2</sub> (dioxyde de carbone) et 85 % N<sub>2</sub> (diazote).

- Elle se multiplie entre 30 °C et 47 °C avec une température optimale de croissance à 42 °C. Elle est dite thermotolérante

**caractères biochimiques :**

- Croissance à 25 °C(-) ; Croissance à 35–37 °C (-) Croissance à 42 °C (+)
- réduction de nitrates (+) ; teste à catalase (+) et oxydase (+)
- Croissance sur agar de MacConkey(+); mobilité (+)
- Consommation de glucose(-) ; Hydrolyse de l'hippurate (+) ; Résistance à l'acide nalidixique (-)
- Résistance à la céphalothine(+).

**Pouvoir pathogène :**

- cause la gastro-entérite, dont le symptôme le plus courant est une diarrhée

*C. jejuni* possèdent le gène de la toxine cytolétale distendante

**3- Caractéristique *E. coli* [9].****Habitat**

- *E. coli* est un germe habituel de la flore intestinale de tous les animaux, y compris les humains .
- C'est un commensal de l'intestin, il représente 80 % de la flore intestinale aérobie.
- La présence d'*E. coli* dans le milieu environnant ou dans les aliments est signe d'une contamination fécale, mais pas obligatoirement une contamination humaine : tous les animaux à sang chaud abritent *Escherichia coli*[22].

**Caractères bactériologique :**

- bacilles à gram négatif, aérobie, soit mobiles par ciliature péritriche, soit immobiles, parfois capsulé [23].

**Caractères cultureux :**

- se développe en 24 heures à 37°C, sur les milieux en donnant des colonies rondes, lisses, à bord réguliers de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées.
- Sur milieux lactoses, les colonies sont généralement lactose positif.
- Sur gélose au sang peuvent être hémolytiques.

**Caractères biochimique :**

- Indoles (+) (exception). - ONPG (+) (exception).
- Mannitol (+)

**Pouvoir pathogène :**

- Infection extra intestinales urinaire, abdominales.
- Méningites néonatales

- Infections intestinales : les entérites (diarrhée aigue) présentant des différents syndromes cliniques (syndrome coliques et dysentériques) due à des *Escherichia coli* différents de sérotypes particuliers [23]

**TABLEAU 5** : Caractéristique des 5 variétés d '*E.Coli* responsable de diarrhée [10].

Genre	Syndromes cliniques	Virulence	Toxines
		Adhésions aux entérocytes	
<i>ECET</i>	Diarrhée liquide profuse	Adhésion aux sommets des microvillosités des entérocytes de l'intestin grêle	Entérotoxines
<i>ECEP</i>	Diarrhée infantiles aigue	Adhésion et destruction des microvillosités des entérocytes de l'intestin grêle	Verotoxine ou Shighalike toxine
<i>ECEH</i>	Diarrhée sanglante, colite hémorragique	Invasion et multiplication dans les microvillosités des entérocytes de colon	Verotoxine ou Shighalike_toxine
<i>ECEI</i>	Dysenterie	Invasion et multiplication dans les entérocytes du colon préférentiellement	Toxines dysentérique
<i>ECEA</i>	Diarrhée infantiles aigue	Non déterminé	Non déterminé

#### **4-Caractéristiques de *Salmonelle***

##### **Habitat**

-On trouve donc les bactéries sur le sol, dans la nourriture, l'eau et tout ce qui a été contaminé par des selles infectées

##### **Caractères bactériologique :**

Ce sont des bacilles à Gram négatif

- mobiles dans toutes les directions grâce à des flagelles.
- Elles sont aéroanaérobies facultatifs

##### **Caractères culturaux :**

Température optimale 35-37°C

- Milieux liquides : après un temps d'incubation de 18- 24h : trouble homogène.
- Milieux solides : Après 24 H Hektoen : Colonies de 2 à 4 mm de diamètre couleur verte (couleur du milieu) avec ou sans centre noir.

-Milieu XLD agar: (Xylose Lysine (XL) agar + thiosulfate de sodium + citrate d' ammonium ferreux + desoxycholate de sodium) : Colonies noires révèlent la production d'H<sub>2</sub>S.

- Milieu DCLS : (Lact-sacch) Colonies incolores, légèrement rosé de 0,5-2 mm de diamètre.

-Milieu SS : les colonies apparaissent incolore (Lactose négatif) à centre noir (production d'H<sub>2</sub>S)

### **Caractères biochimique :**

Ce sont des entérobactéries bacilles à Gram négatifs mobiles pour la plupart (ciliature péritriche), mais certaines sont immobiles,

- aéro-anaérobies facultatifs, oxydase(-), nitrate réductase(+), fermentative du glucose, lactose(-), H<sub>2</sub>S (+) ;uréase (-), lysine décarboxylase (+)

-utilisant la voie des acides mixtes, indole(-)

-ne possédant pas la bêta-galactosidase,

### **Pouvoir pathogène :**

-Toxi-infections alimentaires ou salmonelloses

-Fièvres typhoïdes et paratyphoïdes

## **5- Caractéristiques de *Shigelle* :**

### **Habitat**

Ne font partie d'aucune flore commensale chez l'être humain, elles sont toutes pathogènes et spécifiques du tube digestif éliminées par les selles.

- dispersées dans les sols et les eaux où elles ne survivent que peu de temps

### **Caractères bactériologique :**

Ce sont des bacilles Gram négatifs, immobiles ; dépourvus de spores.

Groupement : Variable, ils se présentent isolés, en diplobacilles et parfois même en chaînettes.

### **Caractères cultureux :**

- milieu basique convient pour la mise en culture tel que la gélose ordinaire ou bien une GTS

### **Caractères biochimique :**

-absence d'uréase, de désaminase et de lysine décarboxylase ;

-absence de production de H<sub>2</sub>S et d'acétone ;

-pas d'utilisation du citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate de Simmons ;

-immobiles ; Les caractères ONPG, mannitol, indole et ODC varient selon les biotype

### **Pouvoir pathogène :**

Responsables des Shigelloses (infections intestinales spécifiquement humaines)  
-sont également responsables de diarrhées aiguës

### **6-Caractéristiques de *Yersinia* :**

#### **Habitat**

-Ce sont des bactéries de l'environnement, présentes dans l'eau, les sols et sur les végétaux.

-Elles se retrouvent également sur les animaux malades ou porteurs sains mais également chez l'homme

#### **Caractères bactériologique :**

Sont des bacilles Gram négatifs, immobiles, dépourvus de spores et de capsules.

Groupement : Variable, Ils se présentent isolés, en diplobacilles et en chaînette

#### **Caractères cultureux :**

-Sur gélose ordinaire après 24 heures d'incubation à 37°C, l'espèce présente des colonies de petites tailles (moins de 1 mm de diamètre) régulières, lisses et brillantes, de type Smooth ; transparentes ou translucides.

-Elles n'évoquent des colonies d'entérobactéries qu'après 36 à 48 heures d'incubation.

Condition de culture :

-Elles possèdent une température optimale de croissance entre 28 et 37 °C. Leur isolement dans un échantillon polymicrobien est facilité à 28°C car les autres entérobactéries ont une température optimale de croissance de 37°C.

-Ce sont des bactéries psychrotrophe, elles peuvent donc se multiplier à 4°C.

- Elles peuvent donc être à l'origine de toxi-infections alimentaires à partir de denrées réfrigérées.

#### **Caractères biochimique :**

Absence de fermentation de lactose, absence de gaz lors de la fermentation du glucose.

-Absence d'utilisation du citrate comme seule source de carbone sur milieu citrate-Simmons

-Absence de désaminase (sauf *Yersinia massiliensis*), de lysine-décarboxylase et de production de H<sub>2</sub>S ;En revanche il y a fermentation constante du mannitol avec un test ONPG positif.

#### **Pouvoir pathogène :**

Ce genre comporte plusieurs espèces responsables de yersiniose parmi les quelles *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*

- mais *Y.pseudotuberculosis* responsable d'infections intestinales caractérisées par des diarrhées et /ou douleurs abdominales et / ou fièvre

### **7- caractéristique de *Vibrio cholera* :**

#### **Habitat :**

-La bactérie *Vibrio cholera* vit dans l'eau et a une grande capacité de survie environnementale .

- Elle tolère très bien la salinité mais ne se trouve pas vraiment en mer plutôt dans les estuaires ; les rivières et les nappes phréatiques et toutes les sources d'eau contaminées par des déjections humaines

-La sueur ; riche en vibrions ; joue un rôle important dans les contaminations inter-humaines surtout en zone tropicale sèche

#### **Caractères bactériologique :**

-Peu incurvé ; très mobiles par ciliature ; monotriche ; mobilité en bac de poisson.

#### **Caractères culturels**

-Culture sur milieux usuels mais le vibron tolère des ph très élevés ; d'où l'emploi d'une eau peptonée alcaline (ph 8.5) et hypersalée (halotolérance) (NaCl 3 %) qui permet l'enrichissement du germe à partir des selles et inhiber la plupart des autres bactéries non halotolérantes

-Milieu sélectif : milieu TCBS et milieu alcalins

#### **Caractères biochimique :**

-Glucose positive ; nitrate réductase + : oxydase + ; sensible au composé O129

#### **Pouvoir pathogène :**

-Prototype du mécanisme du à une enterotoxine

-La diarrhée profuse

### **8- caractéristique de *Klebsiella pneumoniae* :**

#### **Habitat :**

-Tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud : peut se trouver dans l'eau, le sol et la poussière

#### **Caractères bactériologique :**

-Ce sont des bacilles à gram négatif, immobiles et capsulés.

#### **Caractères culturels :**

-Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* sont lactoses positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine

-D'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 à 24 heures à 37C o

-En milieu liquide (bouillon nutritif, eau péptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30 ° et 37 ° C pour *Klebsiella pneumoniae* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. A 10 Co

-Croissent à 44 ° C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80 % en fermentant le lactose avec production de gaz

**Caractères biochimique :**

-Fermentation des sucres : glucose+

-Réduction des nitrates en nitrites : NO<sub>3</sub>+

-Métabolisme du tryptophane en indole : ind -ONPG+ ;ornithine décarboxylase : ODC- ;H<sub>2</sub>S-urease+ ; TDA - ; VP+ (réaction de Voges-Proskauer)

**Pouvoir pathogène :**

- Germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, généralement des infections urinaires, des pneumopathies et des septicémies.

# **CHAPITRE III**

**TRAITEMENT ET PROPYLAXIE DES**

**DIARRHEES AIGUSE CHEZ LES**

**NOURRISSONS**

## **CHAPITRE III : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE DES DIARRHÉES AIGUES :**

### **1. le Principe :**

Le diagnostic étiologique de la diarrhée par des examens au laboratoire ne peut être fait couramment, et il est également impossible sur les seules manifestations cliniques. Les traitements du diarrhéique doit donc être basé sur les principaux caractéristiques de la maladie et la compréhension de la pathogénie sous-jacente [10].

#### **Les principes essentiels du traitement sont les suivants:**

\* une diarrhée aqueuse quelle qu'en soit l'étiologie, exige le remplacement des liquides et des électrolytes perdus.

\* l'alimentation doit être poursuivie, dans toutes la mesure du possible, dans tous les types de diarrhée, et augmentée pendant la convalescence afin d'éviter tout effet néfaste sur l'état nutritionnel

\* les antibiotiques et les antiparasitaires ne doivent pas être systématiquement utilisés ; la plupart des épisodes diarrhéiques, y compris lorsqu'ils sont graves et accompagnés de fièvre, ne répondent pas à un tel traitement. Les exceptions sont :

✓ la dysenterie, doit être traité par un antibiotique actif sur *Shigella*; quand aux quelques malades qui ne répondent pas à ce traitement, une amibiase éventuelle doit être recherchée et traité

✓ la suspicion de cholera avec déshydratation grave

✓ lorsque des trophozoïtes ou des kystes de *Giardia*, ou lorsque des bactéries entéro-pathogènes sont mises en évidence dans les selles par des examens appropriés.

\* Le but recherché dans le traitement d'une déshydratation due à la diarrhée est de corriger rapidement les déficits hydro-électrolytiques (c'est ce qu'on appelle « thérapie de réhydratation») puis de remplacer les pertes au fur et à mesure qu'elles surviennent jusqu'à cessation de la diarrhée (c'est le «traitement d'entretien»). Elles peuvent être remplacées par voie orale ou intraveineuse.

### **2.TRO :**

Le principe de la TRO (la thérapie par réhydratation orale) est que l'absorption intestinale du sodium (et, de ce fait, des autres électrolytes et l'eau) est favorisée par l'absorption active de certaines molécules alimentaires comme le glucose ou les acides aminés. Par chance, ce processus se produit normalement pendant une diarrhée

sécrétoire alors que d'autres voies d'absorption intestinale du sodium sont altérées. Ainsi si les maladies atteintes de diarrhée sécrétoire boivent une solution salée isotonique ne contenant ni glucose ni acides aminés, le sodium n'est pas absorbé et le liquide demeure dans l'intestin, augmentant en définitive le volume de selles émises par le malade. A l'inverse, lorsqu'on administre une solution équilibrée isotonique de glucose et de sels, une absorption de sodium lié au glucose se produit et s'accompagne de l'absorption d'eau et d'autres électrolytes.

Ce processus peut corriger les déficits hydro-électrolytiques et compenser, chez la plupart des sujets atteints de diarrhée sécrétoire, des pertes fécales ultérieures, quelque soit la cause de la diarrhée ou l'âge du patient [10].

### **3. Solution de SRO :**

La solution de SRO a été utilisée pour traiter des millions de cas de diarrhée de toutes étiologies chez des malades de tous les âges, et s'est révélée remarquablement efficace et exempte de danger. Néanmoins étant donné que les concentrations d'électrolytes dans les selles varient selon les types de diarrhée et l'âge des patients, les médecins hésitent parfois à utiliser qu'une seule solution de SRO dans les toutes situations cliniques. Les selles des cholériques contiennent des quantités relativement élevées de sodium, de potassium et de bicarbonate. Chez les enfants atteints de diarrhée aiguë non cholérique, les concentrations de sodium, de bicarbonate et de chlorure dans les selles sont plus faibles bien que très variables. Un enfant atteint de déshydratation due à une diarrhée présente un déficit en sodium et en eau. Dans les cas de déshydratation sévère, on a pu estimer que le déficit en sodium était de 70-110 mmol pour chaque litre d'eau perdu. La concentration de sodium de 90 mmol/L dans la solution de SRO se trouve comprise dans ces limites et convient par conséquent au traitement de la déshydratation. Au cours de la phase d'entretien toutefois, lorsqu'on utilise les SRO pour remplacer les pertes continues d'eau et d'électrolytes dans les selles, la concentration de sodium excrétée dans les selles est en moyenne de 50 mmol/L. Si une solution spéciale contenant 50mmol/L de sodium peut corriger ces pertes, le même résultat peut être obtenu en administrant la solution standard de SRO, accompagné d'un apport normal d'eau ou de lait maternel. Cette méthode permet d'abaisser la concentration moyenne de sodium ingérée à un niveau où elle est sans danger et efficace ; tout excédant modéré de sodium et d'eau étant excrété dans les urines. Cela est particulièrement important chez les jeunes nourrissons dont la fonction rénale n'a pas atteint son maximum. Une autre solution, plus efficace et de moindre osmolarité (avec concentrations réduites de sodium et glucose, associé avec moins de vomissements moins d'émissions de selles, et un besoin réduit de perfusions intraveineuses en comparaison avec des solutions de

réhydratation orale standard) a été développée pour un usage global. La solution de réhydratation orale hypotonique de l'OMS est aussi recommandée pour traiter les enfants atteints de choléra [10].

#### **4 . Prophylaxie :**

La prophylaxie repose sur des actions touchant à la démographie, aux conditions socioéconomiques, l'environnement culturel, la lutte contre la malnutrition, le mode d'alimentation (allaitement maternel), la contamination de l'eau et des aliments et les possibilités de défenses immunitaires du sujet. Pour les enfants vivant en collectivités se pose essentiellement le problème de la transmission de germes pathogènes par les aliments, le matériel, le personnel soignant et les porteurs sains asymptomatiques. L'isolement des sujets infectant, le respect des règles d'hygiène (désinfection, lavage des mains, blouses de protection), l'éviction des porteurs asymptomatiques, sont des mesures fondamentales lors d'une épidémie. Les antibiotiques à visée préventive sont inefficaces pour les sujets non encore infectés et pour les porteurs asymptomatiques [5].

#### **5. Diététique :**

La nécessité d'une alimentation précoce, voire très précoce 4 heures après le début de la réhydratation, n'est plus à discuter : elle maintient ou améliore l'état nutritionnel sans aggraver le syndrome diarrhéique. Les conclusions des études récentes et les recommandations actuelles peuvent être résumées de la façon suivante.

✓ Pour les enfants atteints de diarrhée aiguë modérée ou bénigne en Europe, une réintroduction rapide de l'alimentation avec le lait habituel de l'enfant, non dilué, doit être proposée dès la 3ème ou 4ème heure de la réhydratation avec une SRO, tout en poursuivant celle-ci. Si l'enfant est nourri au sein, l'allaitement maternel sera maintenu pendant toute la durée de l'épisode diarrhéique.

✓ Il n'y a pas plus de complications et de rechutes chez les enfants avec déshydratation modérée ou absente qui reçoivent immédiatement un lait non dilué que chez eux à qui une réintroduction progressive est proposée. L'utilisation de formules pauvres en lactose n'est justifiée que si l'enfant reçoit une alimentation lactée exclusive et n'a pas d'aliments solides riches en pectine[5].

#### **6. Médicaments “ anti-diarrhéiques ” :**

Pour diminuer le volume de l'excrétion fécale ou augmenter sa consistance de nombreux médicaments ont été proposés. Les dérivés de l'épinéphrine et de la norépinéphrine (lidamide, clonidine) la chlorpromazine, et les dérivés de

l'indométhacine sont contraindiqués en raison de leurs effets secondaires. Les produits dérivés de la somatostatine (octreotide) sont efficaces sur le contrôle de la sécrétion intestinale, cependant après l'administration d'une dose de charge ils nécessitent une administration régulière par voie sous-cutanée.

L'acétorphan a fait l'objet d'études contrôlées chez l'enfant et son activité antisécrétoire semble certaine par diminution du nombre et du volume des selles. Les médicaments inhibiteurs de la motricité intestinale comme le loperamide ne doivent plus être prescrits comme le recommande l'OMS, en raison de leur inutilité. Un autre groupe de médicaments est constitué par les substances qui visent à épaissir les selles soit en absorbant l'eau contenue dans la selle, soit en renforçant sa consistance par effet de liant ou d'hyperviscosité. L'efficacité de produits à base de caroube, de pectine, de kaolin ou de gel d'alumine n'a jamais été prouvée. Les silicates et argiles naturelles comme la diosmectite sont largement utilisés. L'OMS déconseille leur utilisation, leur efficacité n'ayant pas été prouvée dans les diarrhées aqueuses ou sécrétoires.

✓ Une place particulière doit être faite pour les probiotiques et modulateurs de la flore. Certaines études ont montré qu'ils diminuaient la fréquence des diarrhées associées à l'antibiothérapie et de certaines diarrhées infectieuses. Enfin ils amélioraient l'évolution des colites pseudo-membraneuses associées à *Clostridium difficile*. Leur intérêt reste toujours à évaluer au cours des diarrhées d'origine virale [5].

## **7. Antibiotiques :**

L'utilisation des antibiotiques dans le traitement des diarrhées infectieuses de nourrisson ne doit pas être systématique en raison de 4 arguments principaux[5]:

1) dans les pays occidentaux les étiologies virales sont 3 fois plus fréquentes que les étiologies bactériennes

2) pour de nombreuses infections bactériennes, l'effet des antibiotiques n'a pas été prouvé comme étant bénéfique

3) le nombre de résistances et de portages asymptomatiques développés après les traitements antibiotiques n'est pas négligeable

4) le délai nécessaire pour obtenir des résultats concernant l'isolation d'un germe par culture de selles et l'étude de sa sensibilité aux antibiotiques est le plus souvent supérieur à la durée de l'épisode diarrhéique.

### **Indications indiscutables de l'antibiothérapie :**

Les shigelloses sont la seule cause de diarrhées bactériennes pour lesquelles l'antibiothérapie raccourcit l'évolution de la maladie et permet l'éradication définitive du germe (20,27). Le choix en première intention repose sur le cotrimoxazole (50 mg/kg/j) ou l'ampicilline (100 mg/kg/j). Dans les cas, rares en Europe, d'épidémies à germes multirésistants, les quinolones (Ciprofloxacine à la dose de 20 mg/kg/j) peuvent être utilisées sur un traitement court de 5 jours. Il est probable que le traitement par une dose unique soit bientôt validé pour certaines souches particulières.

Pour le vibron cholérique il faut insister sur le fait que sur le plan individuel c'est la réhydratation par voie orale qui est le seul traitement susceptible de réduire l'hypersécrétion intestinale et de corriger les troubles hydro-électrolytiques (20,27). L'indication de l'antibiothérapie n'est justifiée qu'en situation d'épidémie au sein de collectivités car si elle réduit peu la durée de la diarrhée, elle diminue surtout la durée du portage et donc le risque de contamination. La tétracycline (50mg/kg/j) ou le cotrimoxazole à la même dose sont les indications de première intention. Cependant les résistances sont fréquentes et l'antibiogramme est indispensable ; l'acide nalidixique ou les fluoroquinolones répondent à ces situations.

Si un épisode de diarrhée aiguë est formellement rapporté à une infection à *Giardia intestinalis* une antibiothérapie par metronidazole (25 mg/kg/j) ou par tinidazole (25-50 mg/kg en une dose) est justifiée.

### **Situations pour lesquelles l'antibiothérapie est discutée :**

Pour les infections à *Campylobacter jejuni* : le traitement n'est indiqué que dans les formes très sévères et chez les enfants immunodéficients. Cependant, l'erythrocline (40-50 mg/kg/j) administrée très tôt peut raccourcir la durée de la diarrhée, diminuer les symptômes et favoriser l'éradication. La durée du traitement doit être de 5 à 7 jours. Les infections à Salmonelles, quels que soient leurs types, ne nécessitent aucun traitement antibiotique si elles sont de résolution rapide et de symptomatologie limitée au tube digestif (diarrhée glairosanglante). Les traitements systématiques entraînent un taux élevé de rechute et le risque d'induction de résistance. Les salmonelloses sévères avec colite invasive intense, fièvre très élevée,

manifestations systémiques et parfois tableau d'angiocholite doivent bénéficier d'une antibiothérapie : ceftriaxone (50 mg/kg/j), cefotaxime (100 mg/kg/j) amoxicilline (50 à 75 mg/kg/j) en première intention ; si après 72 heures aucune amélioration n'est notée on utilisera la ciprofloxacine à la dose de 20 mg/kg/j pendant 5 jours.

Les tableaux cliniques réalisés par les différentes souches d'*Eschérichia coli* dues à des mécanismes infectieux spécifiques pour chacune ne permettent pas de généraliser les indications de l'antibiothérapie. Si l'évolution de la symptomatologie n'excède pas 3 jours et si la tolérance clinique est bonne il vaut mieux privilégier l'abstention thérapeutique. Pour des situations individuelles préoccupantes c'est le cotrimoxazole (50 mg/kg/j) qui reste le médicament de choix. Deux indications spécifiques sont représentées par les formes dysentériques dues à EIEC et les infections à EHEC ou le cotrimoxazole donné très précocement pourraient prévenir la survenue d'un syndrome hémolytique et urémique ; par contre, commencé plus tardivement lorsque cette complication est patente il aurait plus d'effet nocif que favorable.

Les formes chroniques de diarrhées et les tableaux pseudo-appendiculaires dus aux yersinioses font habituellement partie des indications d'un traitement par cotrimoxazole.

Les diarrhées associées à la présence de *Clostridium Difficile* doivent d'abord bénéficier de l'arrêt de l'antibiothérapie qui est le plus souvent la cause de son émergence. L'utilisation de *Saccharomyces boulardii* dans ces situations ayant été prouvée comme efficace. Ce ne sont que les formes majeures de colite pseudomembraneuses associées au *Clostridium*, et prouvées par endoscopie, qui justifient le traitement par vancomycine (20 mg/kg/j) ou metronidazole (25-30 mg/kg/j) [5].

# Études cliniques au laboratoire

## **1. Protocol :**

Notre études et réalisent au niveau de laboratoire microbiologie de l'hopital Khemis Miliana Wilaya de Ain-defla sur différents échantillons de selle des nourrissons.

### **Examen microbiologique des selles (coproculture)**

La coproculture est une étape de l'examen microbiologique des selles. Elle correspond à l'ensemencement de milieux généralement sélectifs pour isoler puis identifier l'agent infectieux [25].

### **Contextes :**

Il existe principalement 4 contextes justifiant un examen microbiologique des selles :

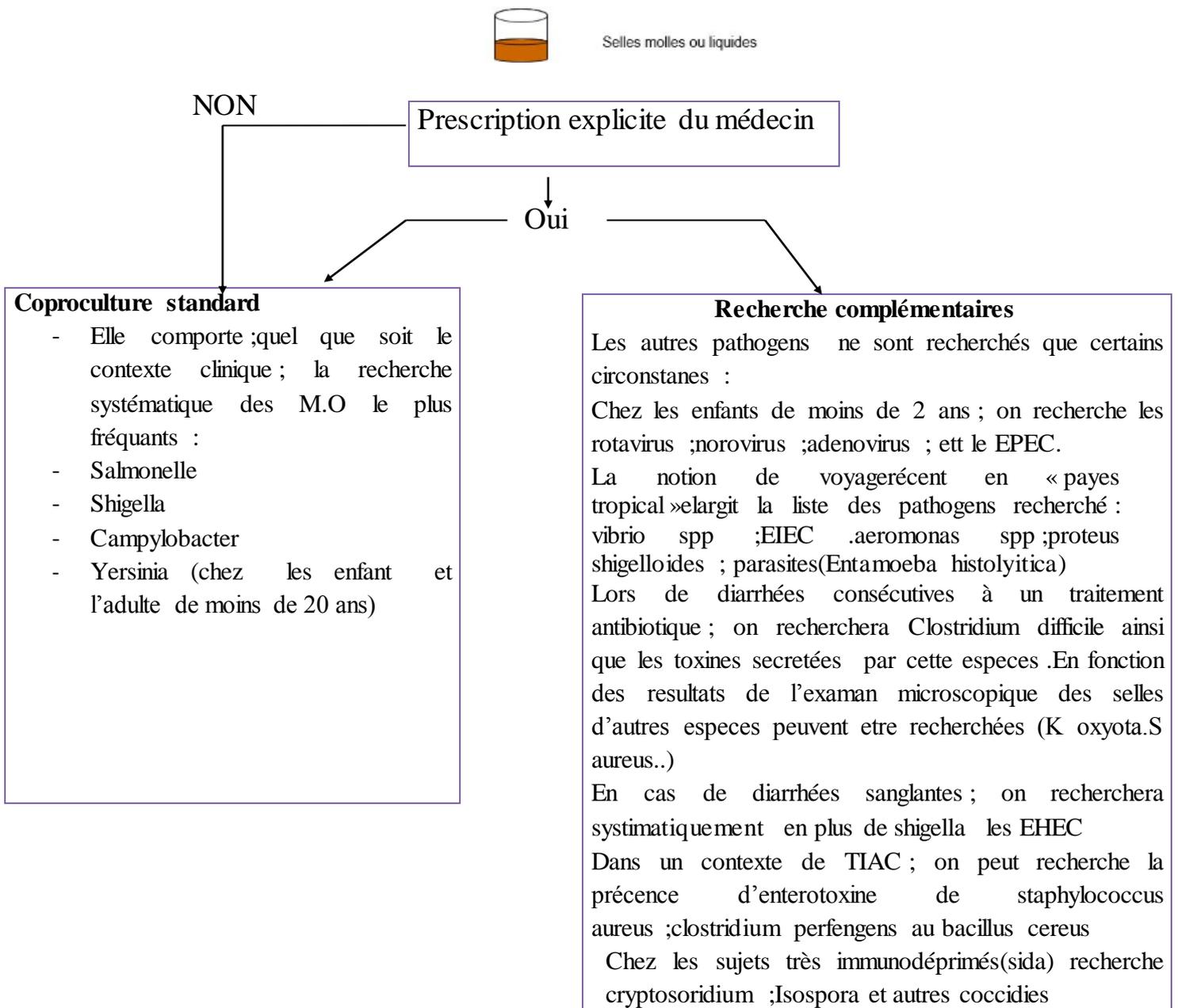
1. Déterminer l'étiologie d'une diarrhée
2. Détecter les porteurs sains de bactéries entéropathogènes. Cet examen a longtemps été pratiqué systématiquement pour le personnel des services de restauration et de l'industrie agro-alimentaire. Désormais, il semble se limiter à des contextes particuliers (personnel de retour de voyage par exemple)
3. Détecter les porteurs asymptomatiques de bactéries multirésistantes aux antibiotiques à l'hôpital.
4. Surveiller les flores de certains sujets immunodéprimés comme les patients aplasiques des services d'onco-hématologie. En raison de leur pathologie, ces patients subissent une décontamination digestive afin de réduire quantitativement une partie de leur flore intestinale. Ainsi cette coproculture quantitative sert à vérifier que l'objectif est atteint [25].

## **2. Déterminer l'étiologie d'une diarrhée**

Pour des raisons d'efficacité et de coût, le laboratoire ne recherche pas systématiquement la totalité des agents susceptibles d'être entéropathogènes[25]. Par conséquent, il est nécessaire d'organiser les investigations en fonction du contexte clinique et épidémiologique :

- ✓ type de diarrhée : inflammatoire ou hydrique ;

- ✓ symptômes associés : douleurs abdominales, vomissements, sang dans les selles, fièvre, altération de l'état général ;
- ✓ âge du malade ;
- ✓ origine géographique ou la notion de voyage récent ;
- ✓ antibiothérapie récente ;
- ✓ immunodépression ;
- ✓ autres cas dans l'entourage



**Figure 1 : Les types de la coproculture**

### **3. Prélèvement des selles :**

Le prélèvement s'effectue de préférence au laboratoire. Le patient transfère l'équivalent d'une noix de selles, à l'aide d'une spatule ou d'un flacon-cuillère, dans un pot stérile en privilégiant les éléments glaireux, sanglants ou d'aspect atypique [25].



**Figure 2 : Recueil des selles**

Chez le nourrisson et le petit enfant, on peut réaliser un écouvillonnage rectal.

Afin d'éviter la dessiccation et la prolifération des bactéries et levures commensales, il faut analyser les selles dans les 2 heures qui suivent leur recueil. Sinon on peut les conserver 12 h maximum à 4°C

Au-delà de ce délai, un système de transport comme le dispositif COPAN fecal swab est nécessaire. Il est composé d'un écouvillon et d'un milieu de transport Cary-Blair (milieu contenant du thioglycolate de sodium et un tampon phosphate) [26].



**Figure 3 : Dispositif COPAN fécal swab**

Différent temps de l'analyses :

Les différentes étapes de l'analyse sont les suivantes :

- ✓ Examen macroscopique des selles
- ✓ Examen microscopiques des selles
- ✓ Coproculture = mise en culture des selles
- ✓ Éventuellement utilisation de tests rapides :
  - mise en évidence de certains agents infectieux ou de leur toxine par des méthodes immunochromatographiques ou immunoenzymatiques
  - mise en évidence de gènes présents seulement présents chez certains microorganismes pathogènes.
- ✓ Étude de la sensibilité aux antibiotiques pour certaines espèces ou selon le contexte

### **3.1.Examen macroscopique des selles**

On notera la consistance (liquides, molles, moulées), la présence de glaires, de pus et de sang.

### **3.2.Examens microscopiques des selles**

#### **État frais**

Faire une suspension homogène de la selle dans l'eau physiologique et examiner entre lame et lamelle à l'objectif X40. À ce propos, la dilution doit être suffisante pour apprécier la mobilité des bactéries mais pas trop forte sinon les recherches sont plus longues.

Ensuite, prélever si possible dans une zone muco-purulente ou sanglante.

Il permet :

- ✓ la recherche des leucocytes fécaux.

Leur présence témoigne d'une inflammation du tube digestif et oriente vers une infection à microorganismes invasifs (Salmonella, Shigella, Yersinia, Campylobacter) . En revanche, on n'en trouve pas dans le cas de diarrhées à microorganismes entérotoxiques ou à virus.

- ✓ de repérer des *Vibrio* et des *Campylobacter* grâce à leur mobilité par ciliature polaire en « vol de moucheron »
- ✓ de rechercher les hématies, les levures.

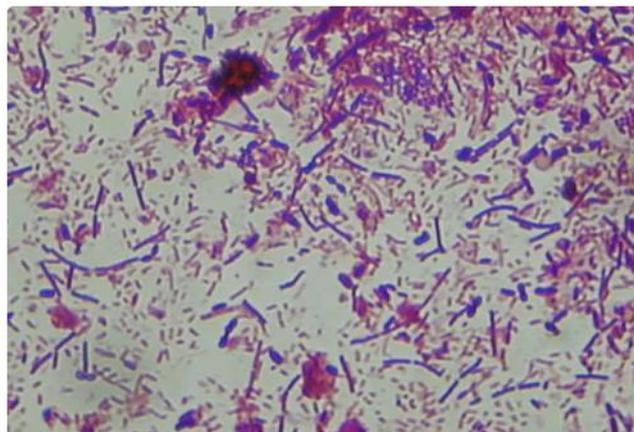
### **3.3. Frottis des selles coloré au Gram**

Premièrement, il s'agit d'apprécier l'équilibre de la flore en déterminant les % de bactéries Gram + et Gram -. En règle générale, les Gram + représentent entre 20 et 30% et les Gram - entre 70 et 80%. Ces pourcentages sont en partie liés aux habitudes alimentaires.

En revanche, un fort déséquilibre (> 90%) correspond très souvent à la colonisation par un microorganisme pathogène.

**À noter que la description précise des bactéries observées est seulement utile s'il y a un fort déséquilibre de la flore.**

Enfin, cet examen permet également de rechercher des bactéries présentant une morphologie particulière tels les *Campylobacter*.



**Figure 4** : Frottis de selles après coloration de Gram (X1000)

© Pascal Fraperie

#### **4. Coproculture[26].**

La coproculture correspond à l'ensemencement de milieux généralement sélectifs pour isoler puis identifier l'agent infectieux. De plus en plus nombreux, les milieux chromogènes sélectifs de dernière génération ont grandement facilité le repérage des agents infectieux présents au sein d'une flore commensale riche et variée.

À noter que pour certains germes la recherche se fait après une phase d'enrichissement.

#### **Apport de la biologie moléculaire au diagnostic des infections intestinales :**

La recherche de microorganismes entéropathogènes par PCR multiplex est en plein essor. Elle présente de multiples avantages par rapport à la recherche par coproculture :

- ✓ Une meilleure sensibilité
- ✓ Un rendu des résultats plus rapide : 2h au lieu de 48h/72h
- ✓ Un temps technicien bien plus faible

Son principal inconvénient actuellement est son coût.

Les laboratoires qui utilisent ces méthodes ont considérablement réduit le nombre des selles mises en culture. En effet la mise en culture se limitent aux selles pour lesquelles les tests moléculaires sont positifs. En outre seuls les milieux correspondants au pathogène détecté sont ensemencés [26].

## 5. Coproculture standard :

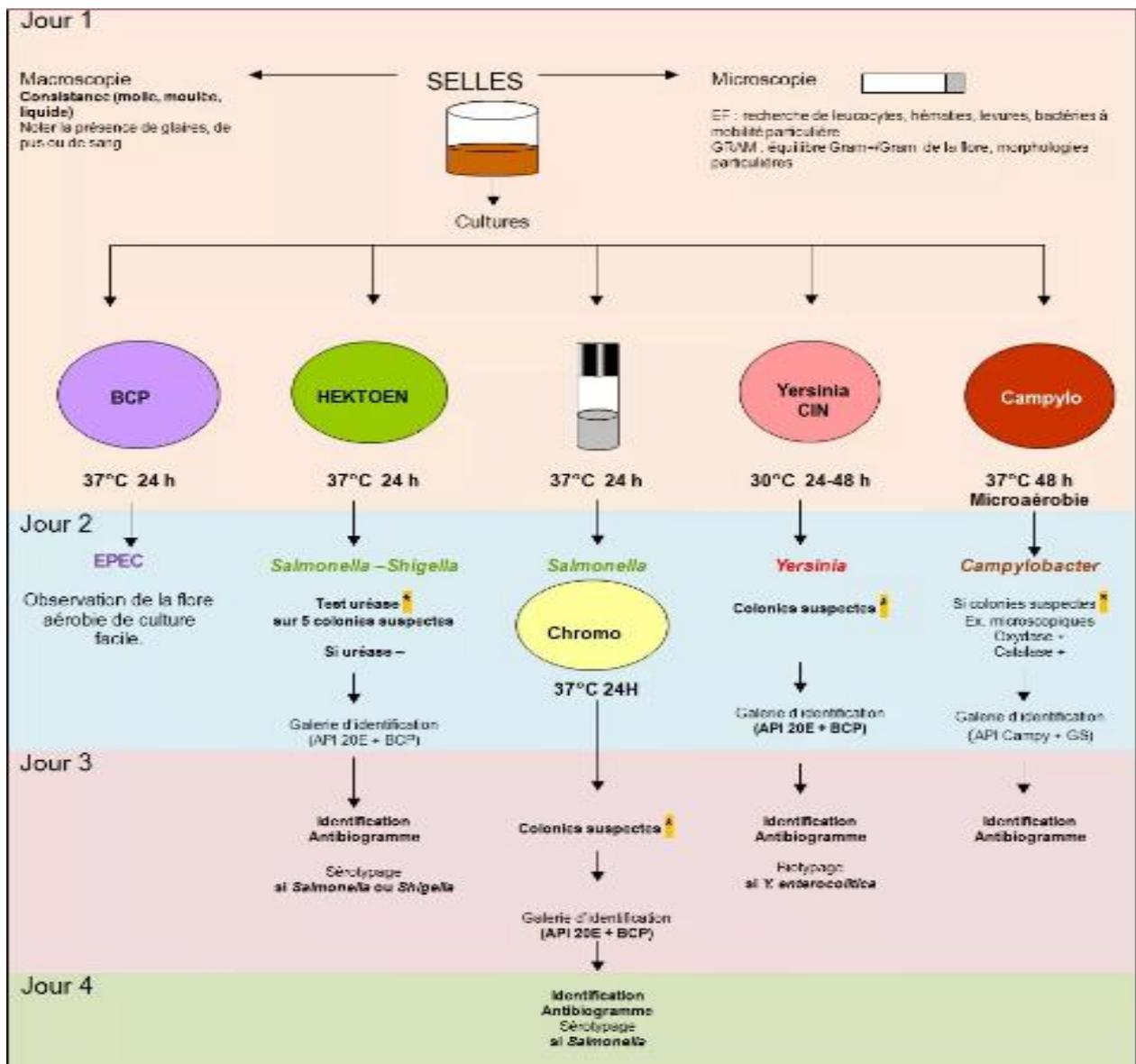


Figure 5 : protocole de la coproculture standard

### 5.1. Recherche des *Salmonella* et *Shigella*

#### Premier jour

##### 5.1.1. Ensemencer un milieu d'enrichissement en *Salmonella*

Pour commencer, notons qu'il n'existe pas de milieu d'enrichissement en *Shigella*

Compte tenu que les *Salmonella* sont souvent en petite quantité dans les selles, on ensemence dès le premier jour, un milieu d'enrichissement. C'est un milieu

sélectif liquide dans lequel les *Salmonella* se multiplient plus rapidement que les microorganismes commensaux du fait de la présence d'agents inhibiteurs [26].

On peut utiliser l'un des milieux suivants :

- ✓ Rappaport (chlorure de magnésium à 30 g/L, vert de malachite, pH à 5.5) à incuber à 37°C pendant 24h ;
- ✓ Rappaport -VASSILIADIS à teneur réduite en vert malachite et à incuber à 41°C pendant 24h ;
- ✓ Milieu au sélénite de sodium, 3 à 6 heures à 37 °C ;
- ✓ Muller Kauffman (vert brillant) 3 à 6 heures à 37 °C ;
- ✓ Milieu tétrathionate-novobiocine (vert brillant, novobiocine) à 37°C.

On ensemence ces milieux avec 5 gouttes de la suspension préparée pour l'état frais.

Le lendemain, on ensemence avec la culture obtenue, un milieu d'isolement sélectif des *Salmonella* (SS, Hektoen, SM2 ou Rambach).

### **5.1.2. Ensemencer un milieu d'isolement sélectif :**

Pour obtenir suffisamment de colonies isolées de *Salmonella* ou de *Shigella*, il faut déposer un inoculum dense (par exemple la suspension préparée pour l'état frais) et l'épuiser au maximum en réalisant des stries serrées.

#### Les milieux d'isollements classiques (conviennent pour *Salmonella* et *Shigella*)

Ces milieux sélectifs inhibent totalement la culture des Gram + et partiellement celle des Gram -. Les milieux les plus satisfaisants sont les suivants :

- ✓ Milieu S.S (Salmonella – Shigella) : permet la croissance des *Salmonella* et plus difficilement celle des *Shigella*
- ✓ Milieu Hektoen : milieu qui permet en particulier une très bonne culture des *Shigella*. Ce milieu contient trois glucides, ce qui augmente son caractère discriminant. Les *Salmonella* et les *Shigella* n'utilisent aucun de ces glucides.

	milieu S.S.	milieu Hektoen
agents inhibiteurs	désoxycholate vert brillant / citrate de sodium	désoxycholate
glucides	lactose	lactose / saccharose / salicine
Indicateur coloré de pH	rouge neutre	bleu de bromothymol et fuchsine acide
production d'H <sub>2</sub> S	thiosulfate de sodium + citrate de fer	
Aspect des colonies de <i>Salmonella</i>	incolores avec ou sans centre noir (lactose – H <sub>2</sub> S+/-)  Fig. 17 : Culture de <i>Salmonella</i> Enteritidis et <i>E. coli</i>	bleues ou vertes avec ou sans centre noir (glucides – H <sub>2</sub> S+/-)  Fig. 18 : Culture de <i>Salmonella</i> Enteritidis et <i>E. coli</i>
	Aspect des colonies de <i>Shigella</i>	incolores sans centre noir (lactose – H <sub>2</sub> S -)  Fig. 19 : Culture de <i>Shigella flexneri</i> et <i>Escherichia coli</i>

**Figure 6 :** Les milieux d'isolement classiques (conviennent pour *Salmonella* et *Shigella*)

## Deuxième jour

### 5.1.3. Isoler sur un milieu sélectif, le bouillon d'enrichissement en *Salmonella*.

De nombreux laboratoires ensemencent les milieux chromogènes (Rambach ou SMID2) seulement après l'étape d'enrichissement.

Remarque : inutile de faire un examen macroscopique et microscopique de ce bouillon.

### 5.1.4. Repérer les colonies suspectes sur le milieu sélectif ensemencé.

#### Sur milieu SS

Des bactéries autres que les *Salmonella* ou *Shigella* et appartenant à la flore commensale peuvent présenter le même aspect sur SS :

- ✓ *Proteus mirabilis* et *vulgaris*, et certains *Citrobacter* sont aussi lactose -, H<sub>2</sub>S+ et forment des colonies semblables au *Salmonella* H<sub>2</sub>S +.
- ✓ *Pseudomonas* (mais ils sont oxydase +), *Providencia*, *Morganella morganii*, certains biotypes d'*E. coli*, *Hafnia alvei*, et les *Serratia* sont lactose -, H<sub>2</sub>S – et forment des colonies semblables au *Salmonella* H<sub>2</sub>S – et *Shigella*.

### Sur milieu Hektoen

Le milieu Hektoen est plus discriminant que le milieu SS car la plupart des espèces, précédemment citées, pouvant être confondues avec les *Salmonella* et les *Shigella* utilisent généralement le saccharose et/ou la salicine et forment donc des colonies saumons, bien distinctes de celles des *Salmonella* et *Shigella*. Cependant *P. mirabilis* n'utilisent pas les glucides de la gélose Hektoen et forment des colonies semblables aux *Salmonella* H<sub>2</sub>S + [25].

### Sur Rambach ou SM2

Les colonies suspectes d'être des *Salmonella* sont des colonies rouges pour Rambach et mauve à rose pâle pour SMID2. (Voir page précédente). Ces milieux sont très discriminants, ainsi la probabilité que ces colonies suspectes soient des *Salmonella* est très élevée [25].

#### **5.1.5. Identification des colonies suspectes**

La démarche d'identification des colonies suspectes dépend des milieux d'isollements choisis pour repérer les *Salmonella/Shigella* et des méthodes d'identification employées.

Pour éviter d'ensemencer une galerie d'identification avec une colonie suspecte sur SS et Hektoen qui ne serait ni une *Salmonella* ni une *Shigella*, des tests préalables sont recommandés.

Les milieux chromogènes sont eux beaucoup plus performants pour différentier les *Salmonella* des autres germes, la galerie d'identification sera ensemencée sans tests préalables.

Enfin si l'identification est faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF, il est possible, étant donné la rapidité du résultat, de tester une nouvelle colonie si la première n'est pas une *Salmonella*. Dans ce cas, les tests préalables ne sont donc pas nécessaires [27].

Afin de ne pas rendre de résultats faussement négatifs, on considèrera qu'il n'y a pas de *Salmonella* ou de *Shigella* seulement après avoir testé au moins cinq colonies suspectes.

### 5.1.6. Démarche d'identification des colonies suspectes sur SS ou Hektoen

Réaliser un test oxydase sur les colonies suspectes H<sub>2</sub>S – afin d'écartier d'éventuels *Pseudomonas*.

Réaliser le test de l'uréase rapide sur les colonies suspectes

Ce test, peu onéreux et rapide, permet d'éliminer les *Proteus* (les *Salmonella* et *Shigella* sont uréase – et les *Proteus* sont uréase +). Il est nécessaire de pratiquer cette recherche sur 5 colonies pour éviter de rendre un résultat faussement négatif dans le cas où les selles contiendraient à la fois des *Salmonella* et des *Proteus*.

Dans 5 tubes à hémolyse on place 3 gouttes d'urée-tryptophane et on introduit dans chacun une colonie suspecte.

Les tubes sont placés à l'étuve à 37°C avec un témoin *Proteus*. On considère le résultat négatif, si le milieu est toujours jaune-orangé, 30 minutes après le virage du témoin *Proteus* et après 4 heures d'incubation.

Poursuivre l'analyse des colonies uréase –

Il s'agit ensuite de poursuivre l'analyse avec toutes les suspensions en milieu urée-tryptophane « uréase négative ».

### 5.1.7. La galerie d'identification comprend :

- ✓ une galerie API 20E ou une galerie composée des milieux suivants (Kligler, Moeller à la lysine, urée-tryptophane, test ONPG)
- ✓ une gélose nutritive en pente (pour faire le sérotypage).
- ✓ un isolement sur milieu lactosé comme BCP pour s'assurer de la pureté de la suspension en urée-tryptophane (l'intérêt du lactose est de vérifier que des colonies lactose positive n'ont pas été prélevées malencontreusement ; précaution nécessaire particulièrement lorsque les colonies suspectes étaient mal isolées).

En toute rigueur, il convient de poursuivre l'identification des seules colonies vérifiées « uréase négative ». Dans ces conditions, la galerie d'identification ne peut êtreensemencée qu'avec une suspension préparée à partir d'une suspension « uréase négative » et non à partir d'une colonie.

La galerie API 20E sera, par exemple,ensemencée après avoir ajouté 4 mL d'eau distillée stérile à une suspension uréase négative. La présence du rouge de phénol provenant du milieu urée-tryptophane peut donner une teinte rosée au test ONPG.

Il faudrait aussi ensemencer autant de galerie d'identification que de suspensions « uréase négative ». Dans la pratique, quand le choix s'est porté sur la galerie API 20E, une seule suspension « uréase négative » est utilisée.

#### **5.1.8.Démarche d'identification des colonies suspectes sur Rambach ou SM2**

Les tests préalables ne sont pas nécessaires.

On se limite alors à l'identification d'une colonie suspecte, par exemple, avec une galerie API 20E et un BCP pour le contrôle pureté.

On prendra soin d'ensemencer une gélose inclinée pour réaliser un sérotypage, le lendemain.

#### **Troisième ou quatrième jour**

Après lecture de la galerie d'identification, si *Salmonella spp* ou *Shigella spp* sont identifiées alors il faut impérativement réaliser leur **sérotypage**

### **5.2. Recherche de *Campylobacter***

Les *Campylobacter* doivent être recherchés systématiquement en cas de diarrhée, au même titre que les *Salmonella*. Leur recherche fait partie de la coproculture standard.

Ces bactéries sont sensibles au dioxygène, les selles sont conservées à +4°C ou acheminées rapidement au laboratoire [28].

Dans un premier temps sera présentée la démarche classique de recherche des *Campylobacter* avant de citer quelques tests récents et performants qui permettent désormais de repérer les *Campylobacter* très rapidement.

## Premier jour

### 5.2.1.Examen direct

A l'état frais, on observe une suspension de la selle au microscope à contraste de phase ou à fond noir (si possible).

*C. jejuni* se reconnaît par sa morphologie et sa mobilité caractéristique en “vol de moucheron”. Cet examen est d'un grand intérêt dans les cas d'urgence, surtout lorsque les *Campylobacter* sont abondants, comme c'est le cas en phase aiguë de la maladie.

#### Après coloration de Gram,

L'aspect est souvent moins évocateur car il est difficile de repérer les *Campylobacter* (fins bacilles à Gram négatif, incurvés ou en S ou de forme spiralée) au sein d'une flore très variée.



**Figure 7 :** *Campylobacter* en culture pure Gram - x100

### 5.2.2.Culture et isolement :

Deux techniques existent et sont complémentaires pour l'isolement sélectif des *Campylobacter*

L'isolement sur milieu sélectif et l'isolement sélectif par filtration directe. Pour la filtration directe, la limite de détection est plus élevée (il faut une concentration de  $10^5$  à  $10^6$  *Campylobacter* par gramme de selle pour avoir une culture positive avec la

filtration contre 10<sup>3</sup> à 10<sup>4</sup> pour le milieu sélectif) mais présente l'avantage d'assurer la culture de certaines souches de *Campylobacter* inhibées sur les milieux sélectifs.

Il semble avantageux d'associer ces deux techniques. La technique de filtration semble dans la réalité, très peu utilisée. Le CNR des *Campylobacter* à Bordeaux l'utilise quand des colonies de *Campylobacter* sont mal isolées et associées à d'autres colonies bactériennes [28].

### Isolement sur milieu sélectif

L'inoculum doit être riche.

Le milieu de base est un milieu nutritif riche type Mueller Hinton ou Columbia. Il est additionné de sang ou de charbon qui ont pour rôle de neutraliser des substances toxiques produites par le métabolisme bactérien.

Un mélange d'antibiotiques est associé afin d'éliminer les bactéries de la flore fécale.

En France, on utilise principalement deux milieux :

- ✓ Le milieu de Karmali contenant 0,4% de charbon, de la vancomycine (pour inhiber les Gram positifs), de la céfopérazone (pour inhiber les bactéries Gram négatifs sauf *Campylobacter*) et actidione (également appelé cycloheximide, pour inhiber les moisissures)
- ✓ Le milieu Campyloesel de bioMérieux : base Columbia enrichie de 5% de sang de mouton et contenant de la vancomycine, de l'amphotéricine B, de la colistine et de la céfopérazone

Sur ces milieux très sélectifs, certaines souches de *Campylobacter* cultivent difficilement.

### Isolement sélectif par filtration direct

On utilise dans ce cas la propriété des *Campylobacter* de passer au travers des mailles d'un filtre Millipore™ 0,45µm alors que les autres microorganismes sont retenus.

On réalise une suspension épaisse de la selle dans un bouillon Brucella agar. Une goutte de cette suspension est déposée sur un filtre Millipore 0,45µm en acétate de cellulose, lui-même placé sur un milieu Mueller Hinton à 5% de sang de mouton.

La filtration dure **une heure à 37°C**. Le filtre est ensuite retiré.



**Figure 8 : Filtration au travers d'un filtre Millipore™ 0,45µm**  
© Pascal Fraperie



**Figure 9 : Culture à l'emplacement du filtre Millipore™**  
© Pascal Fraperie

#### Conditions d'incubation :

Les *Campylobacter* sont microaérophiles. La concentration optimale en oxygène est de 5 à 6%. Les milieux sont donc incubés en atmosphère microaérobie contenant 5% d'O<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> et 85% d'azote. ( Exemple : sachets GENbox microaer de bioMérieux) *C.jejuni* et *C.Coli* se développent à 37°C et à 42°C (espèces thermophiles). Les autres *Campylobacter* moins fréquents dans les selles ne se développent qu'à il est donc conseillé d'incuber les boîtes entre 24h et 72h à 37°C et obligatoirement en atmosphère microaérobie.

Deuxième, troisième jour 37°C.

#### **5.2.3.Repérage des colonies suspectes**

Les *Campylobacter* donnent de petites colonies luisantes (1 à 2 mm de diamètre), non hémolytiques, grisâtres ou translucides selon les espèces, rondes, lisses, bombées ou plates, ayant tendance à l'envahissement.



**Figure 10** : Culture de *Campylobacter* – 48h à 37°C en microaérobie  
© Pascal Fraperie

#### 5.2.4. Réaliser un Gram, un état frais, un test oxydase

Les *Campylobacter* sont caractérisés par leur morphologie en « vol de mouette », leur mobilité grâce à une ciliature polaire et un test oxydase +

#### 5.2.5. Identification

- ✓ par spectrométrie de masse MALDI-TOF
- ✓ ou avec une galerie API Campy (bioMérieux)



**Figure 11** : Profil sur API Campy d'une souche de *Campylobacter jejuni*  
© Pascal Fraperie

**Tableau 14 :** Quelques caractères différentiels d'espèces de *Campylobacter* et genre apparenté

	Culture				Hippuricase	Antibiotiques		uréase	Nitrate réductase	H <sub>2</sub> S
	Catalase	Air	25°C	42°C		Acide nalidixique <sup>(1)</sup>	Céfalotine <sup>(1)</sup>			
<b>Groupe thermophile</b>										
<i>C. jejuni ssp jejuni</i>	+	-	-	+	+	S*	R	-	+	-
<i>C. jejuni ssp doylei</i>	v	-	-	-	+	S	S	-	-	-
<i>C. coli</i>	+	-	-	+	-	S*	R	-	+	+faible
<i>C. lari</i>	+	-	-	+	-	R	R	-	+	-
<i>C. lari biovar UPTC</i>	+	-	-	+	-	S	R	+	+	-
<i>C. upsaliensis</i>	v	-	-	+	-	S	S	-	+	-
<b>Groupe « fetus »</b>										
<i>C. fetus</i>	+	-	+	v	-	R	S	-	+	-
<i>C. hyalointestinalis</i>	+	-	v	v	-	R	S	-	+	+
<i>Arcobacter butzleri</i>	v	+	+	-	-	S*	R	-	+	+

V : variable ; S : sensible ; R : résistant ; (1) : les souches sont considérées comme sensibles dès qu'un diamètre d'inhibition existe ; \* : certaines souches sont résistantes. Rmq : la recherche de la sensibilité à l'acide nalidixique est moins intéressante depuis que des souches ont acquis une résistance.

### 5.3. Recherche de *Yersinia*

Les *Yersinia* ont la particularité se développer plus lentement que les autres entérobactéries et d'avoir une température optimale de croissance inférieure (28°C au lieu de 37°C). Dans un produit polymicrobien comme les selles et dans les conditions de culture classiques (24h à 37°C), ces bactéries sont le plus souvent masquées par la flore digestive. L'utilisation systématique d'un milieu sélectif incubé à 28°C a permis d'améliorer leur repérage.

#### 5.3.1. Premier jour

L'enrichissement en *Yersinia* est rarement pratiqué. Il existe deux possibilités pour le réaliser :

- ✓ ensemercer un bouillon contenant du vert de Malachite et de la carbénicilline ;
- ✓ ensemercer un bouillon nutritif et l'incuber à 4°C pendant 3 semaines (on utilise le caractère psychrophile des *Yersinia* pour augmenter leur proportion).

De nombreux laboratoires se limitent à l'ensemencement d'un milieu sélectif approprié : le milieu *Yersinia* CIN. Sa sélectivité élevée permet d'inhiber la presque totalité de la flore associée (désoxycholate, cristal violet, irgasan, cefsulodine et novobiocine). La présence de mannitol et de rouge neutre facilite le repérage des colonies et permet une orientation présomptive de *Y. enterocolitica*.

Après ensemencement, le milieu est incubé entre **28 et 30°C** (température optimale de croissance des *Yersinia*).

D'après le BEH n° 29 du 13 juillet 2010, les techniques d'enrichissement n'améliorent pas de façon notable le taux d'isolement des *Yersinia* pathogènes. Ce milieu ne permet cependant pas la croissance de toutes les *Yersinia* entéropathogènes, et de plus il inhibe certaines souches de *Y. pseudotuberculosis*.

### 5.3.2. Deuxième jour

Après 24 h d'incubation, les colonies de *Yersinia* apparaissent **petites (1 mm de diamètre)** translucides à centre rouge ou entièrement rouges (**mannitol +**). La taille des colonies est supérieure après 48 h d'incubation.

Remarque : malgré la sélectivité élevée de ce milieu, certaines souches, par exemple de *Citrobacter* et d'*Enterobacter*, peuvent cultiver sur ce milieu cependant elles forment après 24h d'incubation des colonies rouges plus grosses (2 à 3 mm) que celles des *Yersinia* (1 mm).



**Figure 12 : *Y. enterocolitica* sur CIN après 24H à 30°C**  
© Pascal Fraperie



**Figure 13 : *Y. enterocolitica* sur CIN après 48H à 30°C**  
© Pascal Fraperie

L'intérêt d'un test uréase rapide est discutable. S'il est positif, il conforte une orientation vers l'espèce *Yersinia enterocolitica* mais s'il est négatif, il ne permet pas d'exclure pour autant cette espèce.

L'identification des colonies suspectes peut être réalisée sur API 20 E. La galerie est ensemencée directement avec les colonies suspectes. Bien que certains caractères métaboliques des *Yersinia* s'expriment mieux à 30°C, afin d'utiliser la base de données de la galerie API 20E, cette dernière sera incubée à 37°C.

### 5.3.3. Troisième jour

Si une souche de *Yersinia enterocolitica* est identifiée, il faut l'envoyer au CNR afin que soit réalisé un biotypage, un sérotypage et un lysotypage. Le biotypage permet de déterminer si la souche appartient à un biotype pathogène, en effet les biotypes 1B, 2, 3, 4 et 5 sont entéropathogènes alors que les souches du biotype 1A sont considérées comme non pathogènes. Le tableau 6 rassemble les principaux tests utiles pour différencier les 6 biotypes de *Y. enterocolitica*.

**Tableau 15** : Caractérisation des différents biotypes

BIOTYPES	1A	1B	2	3	4	5
Salicine	+	-	-	-	-	-
Pyrazinamidase	+*	-	-	-	-	-
Esculine	+/-	-	-	-	-	-
Lipase	+	+	-	-	-	-
Indole	+	+	V	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	-	V
Tréhalose	+	+	+	+	+	-
Pathogénicité	Non pathogène	Très pathogène	Pathogène	Pathogène	Pathogène	Pathogène
Fréquence en France	Très fréquent	Presque jamais	Fréquent	Peu fréquent	Très fréquent	Presque jamais

## 6. Coproculture complémentaire :

Elle est réalisée en cas d'échec de la coproculture standard.

C'est sur **prescription explicite du médecin** que le laboratoire peut être amené à rechercher des microorganismes moins courants correspondants à des contextes cliniques particuliers.

### 6.1 Recherche des EPEC

La recherche des EPEC est réalisée uniquement sur les selles d'enfants de moins de 2 ans [30].

Le gram montre souvent une **monoflore de bacilles Gram négatifs** très caractéristique.

Les selles diluées sontensemencées sur milieu BCP (ce milieu non sélectif permettra d'apprécier l'abondance des colonies suspectes par rapport à la flore commensale). On peut associer un isolement sur **Drigalski**, Mac Conkey ou EMB.

Le lendemain, on recherche les colonies suspectes qui sont des colonies lactose +, en grand nombre, puis on vérifie ensuite que ces colonies suspectes sont bien

des *E. coli* en étudiant leurs caractères biochimiques (par une galerie API 20E par exemple) [30].

## **6.2. Recherche des EHEC :**

La recherche des EHEC se justifie chez des malades présentant une diarrhée d'abord liquide puis sanglante et impérativement en cas de SHU (syndrome hémolytique et urémique). Habituellement, la diarrhée apparaît 2 à 3 jours après la consommation de viande de bœuf insuffisamment cuite (contamination la plus fréquente en France). Les EHEC isolés appartiennent dans environ 80% des cas au sérotype O157 H7.

Les souches d'*Escherichia coli* O157 se différencient des autres *E. coli* par :

- ✓ Une absence de fermentation du sorbitol
- ✓ Une absence de  $\beta$  glucuronidase

Un des premiers milieux mis au point pour leur isolement est la **gélose SMAC** : une gélose Mac Conkey dont le lactose est remplacé par du sorbitol. Le milieu **SMAC-CT** (Céfixime, tellurite) plus sélectif, inhibe mieux la flore commensale [30].

## **6.3. Recherche des ETEC et des EIEC :**

Les ETEC et les EIEC sont rares en France, seuls des laboratoires spécialisés les recherchent.

Ils utilisent des techniques de biologie moléculaire qui consistent à mettre en évidence les gènes codant les facteurs de pathogénicité et qui caractérisent chaque pathovar[30].

## **6.4. Recherche de *Vibrio cholerae* :**

En France, on recherche *Vibrio cholerae* chez les malades présentant une diarrhée au retour d'un voyage en Afrique, Asie ou Amérique latine. Les selles des patients atteints de choléra sont fécaloïdes pendant les premières heures de la maladie puis liquides et dans les cas extrêmes aqueuses avec des grains riziformes. La recherche peut aussi être effectuée à partir des vomissements du patient.

*V. cholerae* étant sensible à la dessiccation et au froid, il faut placer le prélèvement dans un milieu de transport ou dans un tube plastique avec quelques gouttes de sérum physiologique et est toujours conservé à température ambiante (ne jamais réfrigérer ou congeler).

### **6.5. Recherche de *Vibrio non cholerae*, *Aeromonas* et *Proteus shigelloides* :**

On recherche ces microorganismes chez les malades présentant une diarrhée aiguë au retour d'un pays tropical ou d'une région côtière au climat tempéré et dans le cas où la coproculture standard s'est avérée négative.

#### **6.5.1. *Vibrio non cholerae* :**

Les *Vibrio non cholerae* sont responsables d'infections intestinales appartiennent aux espèces *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. holisae*. Le protocole de leur recherche est semblable à celui de *Vibrio cholerae*, sauf que l'analyse est poursuivie sur toutes colonies de plus de 2 mm de diamètre obtenue sur TCBS (Saccharose + ou Saccharose -). Pour les raisons indiquées au 4.3.2, la galerie API 20E est préférée à l'API 20 NE.

#### **6.5.2. *Aeromonas* :**

Les *Aeromonas* responsables de diarrhées appartiennent aux espèces *A. hydrophila* et *A. veronii*. Ils se développent bien sur le milieu Hektoen, mais donnent des colonies semblables aux *E. coli* commensaux. Pour faciliter leur repérage, on peutensemencer une gélose au sang de mouton + ampicilline à 20 µg/mL. Les colonies d'*Aeromonas* apparaissent, en 24 h, entourées d'une large zone d'hémolyse bêta et tendent à virer au vert brunâtre en 48 h.

L'oxydase est positive et ils résistent au composé vibriostatique O129. Les galeries API 20 NE ou API 20E conviennent à leur identification.

#### **6.5.3. *Proteus shigelloides* :**

*Proteus shigelloides* (anciennement nommé *Plesiomonas shigelloides*) cultive aussi sur Hektoen (colonies vertes plus larges que celles de *Shigella*). Le test oxydase est positif (exceptionnel pour une entérobactérie). L'identification peut se faire sur galerie API 20E.

## 6.6 Recherche des microorganismes responsables des diarrhées post-antibiotiques

*Clostridium difficile* est de loin l'agent infectieux le plus fréquemment en cause dans les diarrhées post-antibiotiques. *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* ou *Candida spp* sont parfois mis en cause mais leur fréquence reste encore à préciser [28].

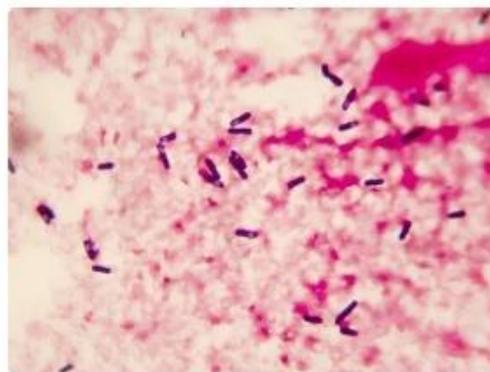
### 6.6.1. Recherche de *Clostridium difficile*

On recherche *C. difficile* chez les malades présentant une diarrhée aiguë qui survient au cours d'une antibiothérapie ou dans les 2 mois suivants l'arrêt de celle-ci. La recherche de *C. difficile* chez les patients asymptomatiques est inutile, car ces patients ne sont pas contagieux. La prescription devra préciser « recherche de toxines de *Clostridium difficile* ». L'analyse des selles doit être rapide (moins de 2 heures après leur émission) sinon on peut les conserver à + 4°C pendant 3 jours au maximum, afin de ne pas altérer l'activité de la toxine B [31].

#### 6.6.1.1. Le diagnostique de présomption :

Le diagnostique de présomption d'infection à *Clostridium difficile* (ICD) repose sur la détection dans les selles d'une enzyme spécifique de *Clostridium difficile* : la GDH. Cette enzyme retrouvée spécifiquement chez toutes les souches de *Clostridium difficile* permet d'obtenir une excellente valeur prédictive négative d'une ICD (c'est-à-dire qu'une ICD est très peu probable si ce test est négatif).

L'examen direct de la selle ne se substitue pas à la recherche de la GDH mais peut cependant être évocateur. En effet, dans 50% des cas, on observe des leucocytes et une flore déséquilibrée dominée par des bacilles à gram positif sporulés avec une spore subterminale peu déformante [31].



**Figure 14 :** Gram d'un frottis de selles avec *Clostridium difficile*

### 6.6.1.2.Le diagnostique de certitude :

Le diagnostique de certitude d'infection à *Clostridium difficile* (ICD) repose sur la mise en évidence des toxines.

En effet seules les souches toxigènes sont pathogènes, en conséquence le diagnostic est positif :

- ✓ si on détecte directement les toxines (A et/ou B) dans les selles d'un patient ;
- ✓ ou si on isole une souche toxigène de *C. difficile* de ces mêmes selles[32].

### 6.6.1.3.La culture toxigénique

C'est la méthode la plus sensible, elle consiste à rechercher les toxines à partir de colonies de *Clostridium difficile*. Pour récupérer plus facilement ces colonies, on dispose de différents milieux sélectifs :

✓ Le milieu CCFA contient deux antibiotiques (Cyclosérine et Céfoxitine) ainsi qu'un glucide (le fructose) et de l'agar. On additionne à ce milieu du jaune d'œuf ou du sang de cheval. Les colonies suspectes après 48h d'incubation en anaérobiose sont plates, de 3 à 5 mm, à bords irréguliers, blanches à grises et non hémolytiques, la culture dégage une odeur caractéristique de « crottin de cheval ».

✓ BioMérieux commercialise depuis peu un milieu chromogène, appelé chromID™ *C. difficile*, qui permet de repérer rapidement les colonies de *Clostridium difficile* [32].



**Figure 15 :** Culture de *Clostridium difficile* sur chromID *C.difficile*

© Pascal Fraperie

### **6.6.2. Recherche de *Klebsiella oxytoca***

*K. oxytoca* a été mise en cause dans des diarrhées sanglantes survenant brusquement pendant une antibiothérapie à base de pénicillines ou plus rarement de céphalosporines.

- ✓ Le Gram montre une dominance de bacilles gram négatif
- ✓ Sur milieux lactosés comme la gélose BCP ou la gélose Drigalski, les colonies de *K. oxytoca* sont Lactose+ et largement majoritaires
- ✓ Poursuivre avec l'ensemencement d'une galerie Api 20 E



**Figure 16 :** *Klebsiella oxytoca* en culture pure sur Hektoen  
© Pascal Fraperie

### **6.6.3. Recherche de *Clostridium perfringens***[29].

*C. perfringens* est à l'origine de toxi-infections alimentaires. Il semblerait que les souches productrices d'entérotoxines soient aussi à l'origine de diarrhées post-antibiotiques. L'isolement de *C. perfringens* à partir des selles peut se réaliser sur gélose au sang de mouton ou sur milieu sélectif comme le milieu TSC (tryptose-sulfite-cyclosérine), tous les deux incubés 24 à 48 heures en anaérobiose.

Le diagnostic de présomption de *Clostridium perfringens* repose sur :

- ✓ l'aspect des colonies : plates, irrégulières, et  $\beta$ -hémolytiques sur gélose au sang (Fig.36)

- ✓ la morphologie au Gram : bacilles à Gram positif aux extrémités carrées, sporulés,
- ✓ leur immobilité
- ✓ leur caractère anaérobie strict
- ✓ l'identification de l'espèce (API20A, Rapid ID32A...)

L'entérotoxine peut être détectée, à partir d'une culture sporulée de *C. perfringens*, par son effet cytopathogène sur culture cellulaire, ou par des tests immunologiques. Le gène correspondant est détectable par PCR [29].



**Figure 17 :** *Clostridium perfringens* sur gélose au sang

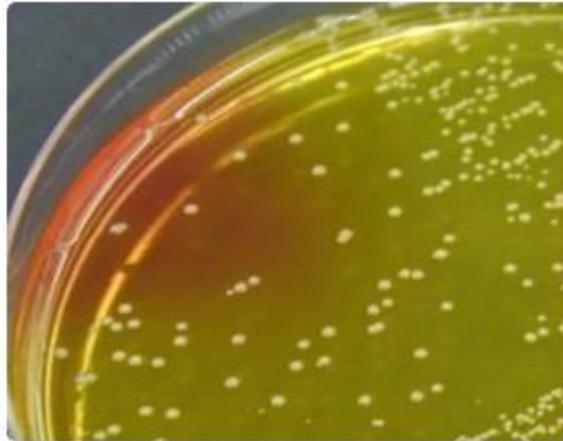
© Pascal Fraperie

#### **6.6.4. Recherche de *Staphylococcus aureus***

Une étude a montré que la plupart des souches de *S. aureus* isolées de diarrhées post-antibiotiques étaient des SARM (*S. aureus* résistants à la méticilline) et produisaient des toxines (entérotoxines A, C et D et la toxine du syndrome du choc toxique TSST-1)

- ✓ Le Gram permettra de suspecter leur présence (flore majoritaire de coques gram +, ronds, souvent en amas)
- ✓ On ensemence une gélose Chapman à partir des selles non diluées.
- ✓ On recherche l'apparition de colonies jaune (mannitol +) sur le milieu Chapman.
- ✓ Vérifier la catalase (+)

Il est possible d'identifier *Staphylococcus aureus* avec un test de coagglutination. Ce test met en évidence la protéine A, le récepteur au fibrinogène et les antigènes capsulaires de *Staphylococcus aureus* [30].



**Figure 18 :** *Staphylococcus aureus* sur Chapman

© Pascal Fraperie

## 7. Conclusion

La **diarrhée** est une maladie que l'on peut prévenir et guérir. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un mauvais moment à passer. Cependant, elle reste la deuxième cause de mortalité chez l'enfant de moins de 5 ans

La **diarrhée aiguë** est responsable de l'évacuation fréquente de selles liquides, avec présence ou non de glaires ou de sang. Elle est souvent associée à des **crampes abdominales**, de la fièvre et une faiblesse générale. Habituellement, l'épisode diarrhéique survient brutalement et prend fin spontanément après 2 ou 3 jours. L'origine de la diarrhée aiguë est très souvent virale. Les intestins infectés vont sécréter de l'eau qui va se mélanger aux aliments en digestion.

La diarrhée aigue est un danger permanent, la prise en charge doit être immédiate par une réhydratation et une réalimentation précoce mais le meilleur traitement reste cependant la prévention.

## Références bibliographiques

- [1].Cézard JP, Chouraqui JP, Girardet JP, Gottrand F et le Groupe francophone d'hépatologie, gastroentérologie et nutrition pédiatrique. Traitement médicamenteux des diarrhées aiguës infectieuses du nourrisson et de l'enfant. Arch Pédiatr 2002;9 :620-8 . (Mise au point et recommandation précisant les mécanismes d'action et les indications des médicaments en fonction de leur catégorie.) - Comité de nutrition de la société française de pédiatrie. Traitement nutritionnel des diarrhées aiguës du nourrisson et du très jeune enfant. Arch Pédiatr 2002;9:610-9. (Mise au point précisant les modalités d'utilisation et indications des solutions de réhydratation et des laits de régime en fonction de l'âge et de la gravité).
- [2].L.BENBERNOU Direction de la Prévention Docteur F.BOUDINAR Pédiatre de Santé Publique (Secteur Sanitaire de Bologhine Alger) Dr.M.CHAOU Docent de Pédiatrie (C.H.U Beni-Messous, Alger) Pr.J.P.GRANGAUD Professeur Chef de Service de Pédiatrie (Direction de la Prévention, MSP) Dr.Ch.KADDACHE Maître Assistant de Pédiatrie (sous directeur SMI, MSP) Pr.M.E.KHIARI Professeur Chef de Service de Pédiatrie (C.H.U Beni-Messous, Alger) Dr.N.LAMDJADANI Maître-assistant d'Epidémiologie (CHU Hussein Dey,Alger) Dr.G..MERBOUT Epidémiologiste de Santé Publique (Secteur Sanitaire de Bologhine,Alger) Dr.O.OUAMAR Epidémiologiste de Santé Publique (Direction de la Santé et de la Population de la Wilaya d'Alger) Dr.A .ZEBIRI Pédiatre de Santé Publique (Secteur Sanitaire de Sidi-M'hamed, Alger) Dr.Z.ZEROUAL Maître-assistante de Pédiatrie (C.H.U Beni-Messous,Alger) Guide de Prise en charge de la diarrhée chez l' enfant liste des membres du groupe de lutte contre les maladies diarrhéiques 2000 (LMD)
- [3].SANOU I\*, KAM K.L.\*, TOUGOUMA A\*, SANGARE L.\*\*\*, NIKIEMA J.H.P.\*, SANOU I\*\*, KOUETA F.\*, DAO L\*, SAWADOGO S.A.\*, SOUDRE R.B. Ministère de la Santé, de l'Action Sociale et de la Famille. Direction de la Médecine Préventive (DMP). Programme national de lutte contre les maladies diarrhéiques au Burkina Faso 1994 - 1998. Ouagadougou 1993 ; 43p
- [4].BARBUT F., LALANDE.V, ECKERT.C. Diagnostic biologique d'une infection digestive à Clostridium difficile. Feuillet de biologie Janvier 2011

- [5].Jean Pierre Olives (article : Pathologie de l'intestin grêle du colon et proctologie ;Facultés de Médecine de Toulouse) Dhiarrée aigue du nourrisson orientation diagnostique p86- 101 )
- [6].DEMERS B., SANSONETTI P. Médecine thérapeutique Pédiatrie Volume 1, Numéro 1, Janvier-Février 1998. Mécanismes moléculaires des diarrhées bactériennes.
- [7].Dominique PLANTAZ Professeur;(article :Diarrhée aiguë du nourrisson) Corpus Médical – Faculté de Médecine de Grenoble Février2004 P3-4)
- [8]. Audrey Foret Pluche. Prise en charge de la diarrhée aigüe du nourrisson en Lorraine.
- [9].Bounab Rahma ;Chekakla Moufida ; Saci Hayette( mémoire pour l'obtention de master2011), titre : Isolement et identification des bactéries responsables d'une infection nosocomiale chez les patients - nouveaux nés, juin 2011, P16-21).
- [10].Brice Hervé FOHOM TAYOU, mémoire obtenir le grade de Docteur en Médecine (Prise en charge de la diarrhée aigue chez les enfants de moins de 5 ans dans le service de pédiatrie du centre de sante de référence de commune v de district de Bamaco 20 juillet 2010)
- [11].OLIVES JP., GHISOLFI J. Diarrhées aiguës. In: NAVARRO J, SCHMITZ J, Eds. Gastroentérologie pédiatrique: 2ème éd. Paris: Médecine Sciences Flammarion; 2000 ; p.273-85
- [12].GENDREL D. Agents infectieux à l'origine des diarrhées aiguës. Mt Pédiatrie janvier-février 1998; vol 1 nOl: 37-40
- [13].QUINET B. Diarrhées infectieuses de l'enfant et du nourrisson. La Revue du Praticien 1996 ; 46 (2) : 177-83
- [14].CERF M., HAGIAGE M. Diarrhées aiguës d'origine infectieuse. Encycl Med Chir. 9061-AI0 : p. 1-20
- [15].MORALI A., VIDAILHET M., ROUSSELOT J.M., et al. Giardiasis with exsudative enteropathy in a child. Nouv Presse Med. 1981 ; 10 (31) : 25-85
- [16].GUANDALINI S. Acute diarrhea in children in Europe: do we know how to treat it? J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008 ; 46 Suppl 2 : Sn-80
- [17].GUARINO A., ALBANO F., ASHKENAZI S., et al. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for

Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008 ; 46 Suppl 2 : S81-122

- [18].OLIVES JP. Diarrhée aiguë du nourrisson. Rev Prat. 1999; 49 (19) : 2153-60
- [19].OLIVES JP., MAS E. Diarrhées aiguës virales: aspects cliniques et évolutifs. Arch Pediatr. 2007 ; 14 Suppl 3 : S152-5
- [20].PELLYE ; Maladies infectieuses ; pp 291,293 ; Pichard E. (2002)Malintropi Afrique : manuel de maladies infectieuses pour l'Afrique, ed. John Liddey Eurotext, Paris, pp589.
- [21].Sayad L ;(2008). Qualité physico-chimique et bactériologique des eaux de l'écosystème lacustre lac des Oiseaux (Wilaya EL Tarf). Mémoire de Magister, Université Badji Mokhtar ; Annaba ;p 110
- [22].FLANDROIS J,P ;2000. Bacteriologie medicale. Collection AZAY ;pp 83, 84,
- [23].NAUCIEL C ; 2000. Bacteriologie medicale; pp 56, 57,58
- [25].DEMERS B., SANSONETTI P. Médecine thérapeutique Pédiatrie Volume 1, Numéro 1, Janvier-Février 1998. Mécanismes moléculaires des diarrhées bactériennes
- [26].DENIS F., PLOY M.C, MARTIN C., BINGEN E., QUENTIN R. 2007. Bactériologie médicale. Techniques usuelles. ELSEVIER-MASSON
- [27].Pierre Gallois, Jean-Pierre Vallée, Yves Le Noc , Diarrhée du nourrisson Faits prouvés et idées reçues, Société Française de Documentation et de Recherche en Médecine Générale revue Médecine. Volume 6, Numéro 1, 18-23, Janvier 2010, Stratégies
- [28].ECKERT C. BARBUT F. Nov 2010. Les diarrhées post-antibiotiques. RFL N°426
- [29].POUMEYROL M. et POPOFF M.R. 2006. *Clostridium perfringens* agent de toxoinfection alimentaire. AFSSA.
- [30]. TEYSSOU R. 2003. Diarrhées infectieuses aiguës. Guides Medi/Bio. Elsevier.
- [31]. ABBADI K. Opéron N° 53 – 2010. *Clostridium difficile* et ses toxines.
- [32].BARBUT F., LALANDE.V, ECKERT.C. Diagnostic biologique d'une infection digestive à *Clostridium difficile*. Feuilles de biologie Janvier 2011