

**PROBLÈMES D'IDENTIFICATION
DES BACTÉRIES ENTÉROPATHOGÈNES
ISOLÉES SUR MILIEU SS**

**(à propos de 1 129 coprocultures réalisées
chez des enfants)**

par

Jean-Paul MOREAU et Gilbert-Noël RAKOTOMALALA

Différents milieux sélectifs pour l'isolement des *Salmonella* et des *Shigella* ont été proposés. Ils ont en commun d'inhiber presque totalement la culture des bactéries gram positives et partiellement celle d'entérobactéries non pathogènes. L'addition de certains sucres permet en outre de distinguer les bactéries qui fermentent ces sucres et d'aider au repérage des salmonelles et des shigelles qui ne les fermentent pas. Dans nos laboratoires nous employons le milieu SS (Salmonelles-Shigelles). Le sucre de ce milieu est le lactose. Toutes les colonies ne fermentant pas ce sucre peuvent être des *Salmonella* ou des *Shigella*. Nous consignons ici les problèmes soulevés par l'identification des bactéries ne fermentant pas le lactose, isolées sur milieu SS entre le mois d'avril et le mois d'octobre 1974 à partir de 1 129 échantillons de selles provenant de l'Hôpital des enfants de Tananarive.

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

— *Le milieu SS :*

Ce milieu contient des inhibiteurs empêchant la culture des bactéries gram positives et l'envahissement par des *Proteus*. La culture des entérobactéries coliformes est partiellement inhibée. La présence de lactose et de rouge neutre permet de reconnaître les bactéries fermentant ce sucre (L +). La présence de citrate de fer permet la détection de la production de l'hydrogène sulfuré (H₂S +).

Schématiquement :

- Les colonies L +, H₂S + sont rouges avec un centre noir (type *Citrobacter*).
- Les colonies L +, H₂S — sont rouges (type *Escherichia coli*).
- Les colonies L —, H₂S + sont incolores avec un centre noir (type *Salmonella* et *Proteus vulgaris* et *mirabilis*).
- Les colonies L —, H₂S — sont incolores (type *Shigella*).

— *L'isolement* :

Il est réalisé soit à partir d'une suspension d'un fragment de selles en eau physiologique soit à partir d'un milieu d'enrichissement pour salmonelles. Le milieu SS coulé en boîte de Petri est d'abord séché à l'étuve à 37° C, puis l'ensemencement se pratique en stries serrées. La lecture s'effectue après vingt-quatre heures d'incubation à 37° C.

— *L'identification* :

Seules les colonies L —, incolores ou incolores à centre noir font l'objet d'un repiquage pour identification car ce sont les seules susceptibles d'être des *Salmonella* ou des *Shigella*.

Dans chaque boîte 5 colonies de ce type sont prélevées et chacune ensemencée sur milieu urée-indole en suspension dense. Après trois heures d'incubation à 37° les tubes virés au rouge sont écartés. Il s'agit en effet d'un *Proteus* qui hydrolyse l'urée en moins de trois heures. A partir des milieux non virés une galerie de tubes est ensemencée comportant :

— une gélose nutritive ordinaire inclinée :

- Recherche de l'oxydase ;
- Epreuve de séroagglutination éventuelle.

— un bouillon nitrate :

- Recherche de la nitrate réductase.

— un milieu de Hajna :

- Fermentation du glucose (avec ou sans gaz) et du lactose ;
- Recherche de la bêta-galactosidase et de la lysine-décarboxylase.

- un milieu urée-indole :
 - Hydrolyse plus ou moins rapide de l'urée ;
 - Recherche de la tryptophane-désaminase ;
 - Production d'indole.
- un milieu de Clark et Lubs :
 - Recherche de l'acétyl-méthyl-carbinol (réaction de Voges-Proskauer = VP).
- un milieu au citrate de Simmons :
 - Utilisation du citrate comme seule source de carbone.
- un milieu mannitol — mobilité :
 - Fermentation du mannitol ;
 - Étude de la mobilité.

L'ensemble de ces milieux correspond à la galerie classique d'identification des *Enterobacteriaceae*. Sa lecture s'effectue après vingt-quatre heures d'incubation à 37°. En réalité cette galerie est insuffisante pour l'identification biochimique des bactéries entéropathogènes. En analysant nos résultats nous mentionnerons les problèmes d'identification qui se sont posés ou qui auraient pu se poser et nous précisons les milieux qui permettent de les résoudre.

II. RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Sur un total de 1 129 coprocultures, 147 (13 p. cent) ont permis l'isolement de colonies ne fermentant pas le lactose (L —) sur le milieu SS. Le milieu au bleu de bromothymol (non sélectif) utilisé parallèlement a révélé dans 982 cas (87 p. cent) la présence de bactéries fermentant le lactose.

Parmi les 147 souches L —, 142 étaient des entérobactéries ; les 5 autres souches appartenaient à d'autres familles (tableau I).

I. Les Entérobactéries

Environ 31 pour cent (44/142) des entérobactéries L — étaient des *Escherichia coli*. Dans 43 cas il s'agissait de souches fermentant tardivement le lactose et possédant une bêta-galactosidase

(ONPG +). Une souche était dépourvue de cette enzyme (ONPG —). Deux souches (dont la souche ONPG —) étaient immobiles et agazogènes appartenant au groupe *Alkalescens-Dispar*. L'une de ces souches ne possédait pas de lysine décarboxylase (LDC —). Cette souche présentait tous les caractères d'une *Shigella*. La séro-agglutination dans ce cas ne peut trancher le problème car il existe des communautés antigéniques entre les deux genres. Il est indispensable d'effectuer, avant l'agglutination, le diagnostic biochimique. Seuls les *Escherichia* sont capables d'utiliser le citrate du milieu de Christensen. Il en va de même de certains acides organiques d'utilisation moins courante (mucate, acétate, glucate).

TABLEAU I

Bactéries Lactose — isolées sur milieu SS
(par ordre de fréquence)

Entérobactéries : 142		
<i>Escherichia coli</i>	44	2 <i>Alkalescens-Dispar</i> . 1 O ⁵⁵ B ⁵ .
<i>Proteus</i>	30	
<i>Citrobacter freundii</i>	23	9 souches H ₂ S — dont 2 indole + (<i>Levinea amalonitica</i>).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17	3 var. <i>oxytoca</i> .
<i>Enterobacter</i>	10	5 <i>E. cloacae</i> . 4 <i>E. aerogenes</i> . 1 <i>E. agglomerans</i> (<i>Erwinia</i>).
<i>Shigella</i>	9	5 <i>Sh. flexneri</i> , 4 <i>Sh. sonnei</i> .
<i>Salmonella</i>	3	3 <i>S. typhi murium</i> . (<i>Levinea malonitica</i>).
<i>Citrobacter diversus</i>	3	
<i>Providencia</i>	2	
<i>Arizona</i>	1	
Autres bactéries : 5		
<i>Moraxella</i>	2	Toutes 2 <i>M. glucidolytica</i> (<i>Herellea vaginicola</i>).
<i>Pseudomonas</i>	1	sp. <i>aeruginosa</i> .
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	

Ajoutons que sur les 44 souches d'*E. coli* L — isolées sur SS une seule appartenait à un type pathogène pour le nourrisson, le type O.55.B5.

Trente souches de *Proteus* ont été isolées et reconnues par leur capacité d'hydrolyser l'urée en moins de trois heures. L'identification des espèces n'a pas été poussée au-delà. Seules *Yersinia pseudo-tuberculosis* et *Y. enterocolitica* qui ont aussi la capacité d'hydrolyser l'urée en moins de trois heures pourraient prêter à confusion. En fait ces germes ne cultivent pas ou trop lentement sur le milieu SS. En cas de doute la recherche de la tryptophane ou de la phénylalanine-désaminase se révèle positive pour les seuls *Proteus*.

Vingt-trois souches de *Citrobacter freundii* ont été identifiées. Toutes possédaient une bêta-galactosidase. Neuf souches ne produisaient pas d'H₂S [parmi celles-ci 2 souches produisaient de l'indole (*Levinea amalonatica*) mais n'utilisaient pas le malonate contrairement à *Citrobacter diversus*]. Les souches H₂S — posent un problème d'identification. La réaction de Voges-Proskauer (VP) permet la distinction avec les *Enterobacter* sauf *E. hafniae* qui est VP — à 37° mais ce germe possède une lysine décarboxylase contrairement aux *Citrobacter*.

Les colonies de *Klebsiella* n'ont pas leur aspect caractéristique sur le milieu SS. Les 17 souches isolées ont été reconnues par leurs caractères biochimiques. Trois souches produisant de l'indole ont été identifiées à la variété *oxytoca*.

En dehors des *Klebsiella*, 10 souches de bactéries VP + ont été isolées qui appartenaient toutes au genre *Enterobacter* : 5 *E. cloacae*, 4 *E. aerogenes* et 1 *E. agglomerans*. Cette dernière espèce se distingue d'*E. cloacae* par l'absence d'ornithine décarboxylase (ODC —).

Nous n'avons isolé aucune souche d'*Enterobacter hafniae*. Ce germe à 37° C est VP —, Citrate de Simmons —, immobile et agazogène. La présence d'une LDC le distingue des *Shigella* et la non production d'indole des *Escherichia*.

Aucune souche de *Serratia* n'a été isolée. Contrairement aux *Enterobacter* ces germes possèdent une gélatinase très active.

Trois souches de *Citrobacter diversus* (*Levinea malonatica*) ont été identifiées. Ce germe ne produit pas d'H₂S mais utilise le malonate contrairement à *Citrobacter freundii*.

L'identification de 2 souches de *Providencia stuartii* n'a pas posé de problème particulier.

Par contre nous avons isolé 1 souche d'*Arizona hinshawii*. Cette souche était ONPG — et avait tous les caractères d'une *Salmonella*. L'utilisation du malonate a permis de la reconnaître.

En ce qui concerne les entérobactéries pathogènes majeures le nombre de souches isolées est relativement faible : 3 souches de *Salmonella* et 9 de *Shigella* sur un total de 1 129 coprocultures. Ceci tient sans doute au fait que le matériel provenait d'un service pédiatrique.

La séro-agglutination a permis d'identifier les 3 souches de *Salmonella* à *S. typhi murium*.

Les 9 *Shigella* se répartissaient en 5 souches de *Sh. flexneri* et 4 de *Sh. sonnei*. Ces 4 dernières souches ont pu être identifiées biochimiquement. En effet seule *Sh. sonnei* possède une ODC en dehors de la très rare *Sh. boydii* 13 (mais cette dernière est indologène).

II. Bactéries autres que les entérobactéries

Bien que le milieu SS soit un milieu sélectif, il permet le développement d'un certain nombre de bactéries gram négatives et L — appartenant à des familles autres que celle des *Enterobacteriaceae*.

La présence éventuelle de tels germes impose la recherche systématique de l'oxydase et de la nitrate réductase. L'identification complète est nécessaire pour reconnaître d'éventuels germes pathogènes (*Vibrions*, *Plesiomonas shigelloïdes*).

Nous avons identifié 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Aeromonas hydrophila*, 2 *Moraxella glucidolytica* (*Herellea vaginicola*) et 4 *Alcaligenes faecalis*.

CONCLUSION

Le but d'une coproculture en dehors du cas particulier des *E. coli* pathogènes des nourrissons est essentiellement l'isolement et l'identification des bactéries pathogènes majeures comme les *Salmonella* ou les *Shigella* ou mineures comme les *Proteus* (autres que *mirabilis*), les *Providencia* ou les *Plesiomonas*.

Toutes ces bactéries ont en commun de ne pas fermenter le lactose et donc de pouvoir être aisément repérées sur les milieux sélectifs.

L'identification de ces bactéries nécessite une gamme de milieux classiques que nous avons énumérés au chapitre matériels et méthodes. Cette gamme est insuffisante.

En effet l'existence d'*Escherichia coli*, immobile, agazogène et LDC — nécessite au minimum l'adjonction d'un milieu au citrate de Christensen qui permettra de les différencier d'une *Shigella*.

L'existence d'*Arizona hinshawii* ONPG — commande l'emploi d'un milieu au malonate pour les distinguer des *Salmonella*. Ce milieu permet en outre le diagnostic différentiel entre *Citrobacter freundii* et *diversus*.

La recherche de l'ornithine décarboxylase permet le diagnostic biochimique de *Shigella sonnei*. Facultativement elle permet la distinction entre *Enterobacter cloacae* et *E. agglomerans*.

La recherche de la gélatinase bien que non indispensable peut aider au diagnostic de *Plesiomonas shigelloides*. Elle permet en outre de distinguer les *Serratia* des *Enterobacter*.

En définitive deux milieux nous paraissent indispensables pour reconnaître les bactéries entéropathogènes ; ce sont le citrate de Christensen et le milieu au malonate. La recherche de l'ODC nous paraît très intéressante ; par contre celle de la gélatinase est facultative.

RÉSUMÉ

L'identification biochimique des bacilles gram négatifs entéropathogènes impose l'emploi du milieu au citrate de Christensen pour distinguer les *Shigella* des *Escherichia coli* immobiles, agazogènes, et dépourvues de lysine-décarboxylase. Le milieu au malonate est indispensable pour le diagnostic différentiel des *Salmonella* et des souches d'*Arizona hinshawii* dépourvues de bêta-galactosidase. La recherche de l'ornithine décarboxylase est intéressante car elle permet le diagnostic biochimique de *Shigella sonnei*.

Remerciements

Nous exprimons nos vifs remerciements au Docteur R. Fourquet, biologiste de l'hôpital Girard-et-Robic de Tananarive qui a bien voulu nous aider de ses conseils et confirmer l'identification des souches de diagnostic délicat.