

Escherichia coli

I. Sérums agglutinants pour le diagnostic des antigènes somatiques d'*E. coli* entéropathogènes pour le nourrisson (EPEC)

I. Sérums agglutinants pour le diagnostic des antigènes somatiques des *E.coli* entéropathogènes pour le nourrisson (EPEC)

PRESENTATION

Les sérums suivants sont présentés en flacons compte-gouttes de 3 ml. Les sérums sont dilués par agglutination sur lames. Ils ne contiennent pas d'agglutinines H.

- 1 sérum nonavalent **code 355-7411**
- 4 sérums trivalents :
 - Mélange I :** **code 355-7331**
O111 + O55 + O26
 - Mélange II :** **code 355-7341**
O86 + O119 + O127
 - Mélange III :** **code 355-7351**
O125 + O126 + O128
 - Mélange IV :** **code 355-7361**
O114 + O124 + O142
- 12 sera monovalents :
 - O111 **code 355-7241**
 - O55 **code 355-7221**
 - O26 **code 355-7211**
 - O86 **code 355-7231**
 - O119 **code 355-7251**
 - O127 **code 355-7281**
 - O125 **code 355-7261**
 - O126 **code 355-7271**
 - O128 **code 355-7291**
 - O124 **code 355-7201**
 - O114 **code 355-7301**
 - O142 **code 355-7311**

DOMAINE D'APPLICATION

Certains types d'*Escherichia coli* peuvent être des agents de diarrhée. On les classe en fonction du mécanisme de leur pouvoir pathogène, en : ***E.coli* entéro-toxinogènes (ETEC)** agents de diarrhées cholériformes, fréquents dans les régions tropicales à hygiène déficiente sévissant surtout chez les enfants de moins de 5 ans et chez les voyageurs qui visitent ces contrées. Dans les régions à hygiène développée, ces ETEC sont rares bien qu'ils peuvent être parfois la cause d'épidémies dans les pouponnières. Leur diagnostic est fait par mise en évidence de l'entérotoxine thermolabile (LT) ou de l'entérotoxine thermostable (ST).

Comme les vibrions cholériques, ils adhèrent aux cellules intestinales mais n'y pénètrent pas.

***E.coli* entéro-invasifs (EIEC)** agents de syndromes dysentériques. Le mécanisme du pouvoir pathogène de ces *E. coli*, qui sont le plus souvent LDC (+) et immobiles, est identique à celui des *Shigella*. Leur dépistage est fait sur le test d'invasivité (en culture de cellules HeLa, ou par la positivité du test de Sereny effectué en déposant une goutte de culture sur l'œil d'un cobaye).

***E.coli* entéro-pathogènes (EPEC)** agents d'épidémies de diarrhée dans les collectivités d'enfants âgés de moins d'un an, de 2 ans au maximum. Les épidémies dues à ces *E.coli* étaient fréquentes jusqu'en 1960 en Europe Occidentale. Depuis, leur incidence a beaucoup diminué sans qu'on en connaisse la raison. Au contraire, dans d'autres pays, ils sont restés la cause majoritaire des diarrhées du nourrisson (tels O111 et O119 au Brésil). Le mécanisme de leur pouvoir pathogène était inconnu jusqu'à ces dernières années, bien que le rôle pathogène ait été démontré par les études épidémiologiques et les essais sur des volontaires. On sait maintenant qu'ils produisent une cytotoxine active sur les cellules Vero (d'où son nom de Vero-toxine ou VT) qui ressemble à celles de *Shigella dysenteriae*. Ces EPEC adhèrent aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et en détruisent les bordures en brosse (d'où les épithètes "attachants-effaçants" qui leur ont été donnés).

Il existe une corrélation entre le sérotype et le pouvoir pathogène des EPEC. Pour définir un sérotype d'*E.coli* mobile, il faut identifier son antigène O, son antigène H et, s'il existe, son antigène K. L'identification de l'antigène H demande plusieurs jours car il faut rendre la souche très mobile. Les antigènes K des EPEC avaient été classés comme étant du type B par Kauffmann, un même antigène B étant lié à un même antigène O (par exemple B4 avec O111). La réalité de ces antigènes B a été contestée par Orskov (Bact. Rev., 1977, 41, 667-720) parce qu'il est impossible de préparer un sérum anti-B sans les agglutinines O correspondantes. C'est pourquoi la terminologie classique du type O111:B₄: H₂ est abandonnée au profit de O111 : H₂.

Escherichia coli

En pratique de laboratoire clinique, on se limite, pour des raisons de rapidité à l'identification de l'antigène O, bien que l'on sache que plusieurs sérotypes O + H, de potentialités pathogènes différentes, peuvent avoir la même spécificité O commune. Cette identification de l'antigène O se fait avec plus de sécurité par agglutination et titrage en tubes.

Mais l'agglutination sur lames, qui donne un résultat immédiat, est très utilisée en laboratoire de Bactériologie médicale parce qu'elle est simple, rapide et ne donne que très peu de résultats erronés quand l'utilisateur a un minimum d'entraînement.

Neuf sérogroupe O d'EPEC sont rencontrés en Europe occidentale :

O111	O86	O125
O55	O119	O126
O26	O127	O128

Par ailleurs, des souches de 3 autres sérogroupe dont l'un (O124) correspond à des souches entéro-invasives, peuvent être rencontrées avec une fréquence plus faible :

- O124
- O114
- O142

Les sérums correspondants ont été préparés en immunisant des lapins par des cultures de 18 h de variants immobiles (H), tués par le formol.

METHODOLOGIE

Isolement de la souche

Il est conseillé d'effectuer tout d'abord sur les selles une coloration de Gram. Dans les selles normales, on observe une grande variété de bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Dans une entérite à *E. coli* de nourrisson, on trouve une très nette prédominance de bacilles à Gram négatif. Cet examen microscopique permettra éventuellement de dépister rapidement les complications dues aux *Candida* ou aux Staphylocoques résistants aux antibiotiques lors d'un traitement prolongé par ces derniers.

- Ensemencer les selles sur un milieu qui ne soit pas inhibiteur pour les *E. coli* (Gélose lactosée au B.C.P., gélose lactosée de Drigalski, gélose lactosée E.M.B.)

Il est conseillé d'effectuer systématiquement en parallèle une recherche de *Salmonella*, de *Shigella* et de *Yersinia enterocolitica*, voire de *Campylobacter* et de *Rotavirus*.

En phase aigüe de la maladie, les *E. coli* entéro-pathogènes sont en culture presque pure.

Agglutination sur lame

Il est important d'utiliser des lames de verre très propres.

Déposer une goutte de sérum sur la lame.

Prélever la culture et la mettre directement en suspension dans la goutte de sérum. Bien mélanger.

Examiner à l'oeil nu sur fond sombre ou, mieux, au-dessus d'un miroir concave.

N.B. : Tout *E. coli* appartenant à l'un de ces sérogroupe donne une agglutination massive totale, d'apparition immédiate.

En pratique courante, le diagnostic est fait en recherchant l'agglutination d'au moins 5 colonies, en premier lieu avec le sérum nonavalent.

Si l'on observe une agglutination avec ce sérum nonavalent, le type antigénique est précisé en utilisant, dans un second temps, les sérums trivalents (Mélange I, II et III), et dans un troisième temps, les sérums monovalents correspondant au sérum trivalent qui aura donné une réponse positive.

Si l'on ne trouve pas d'agglutination dans le sérum nonavalent, on utilise de la même manière que ci-dessus, le sérum "mélange IV" correspondant au type actuellement peu fréquent. Les colonies agglutinées par ce sérum sont étudiées dans les sérums monovalents composant ce mélange.

Remarques :

Il arrive parfois que des souches soient agglutinées par le sérum nonavalent seul, ou par le nonavalent et les trivalents, mais ne soient pas agglutinées par les sérums monovalents. Ce phénomène non spécifique est dû à la grande quantité de protéines contenues dans les mélanges de sérums. Seule, l'agglutination typique dans l'un des sérums monovalents permet le diagnostic.

Une agglutination tardive, fine en général, n'a aucune valeur diagnostique. Elle peut être observée avec des souches ayant des fractions antigéniques O communes avec les *E. coli* entéro-pathogènes. De même, une agglutination fine dans tous les sérums fera suspecter l'état R d'une souche. Dans ce cas, la souche est également auto-agglutinable en eau physiologique.

Il est préférable de rechercher ces agglutinations en utilisant des cultures sur milieu gélosé ou lactosé, plutôt que des cultures sur gélose nutritive ordinaire.

Il existe des facteurs antigéniques communs

Escherichia coli

entre les sérogroupes O86 et O127.

Ces souches sont fortement agglutinées par le sérum homologue, plus tardivement et avec une intensité nettement moindre par le sérum hétérologue.

AGGLUTINATION EN TUBES

Pour contrôler l'agglutination sur lames, il est possible, en cas de doute d'avoir recours à un titrage en tubes.

Les mêmes sérums sont utilisés, en tenant compte de leur taux de dilution : 1/20.

Comme antigène, nous conseillons d'employer une culture de 6 à 8 heures en bouillon :

- Une partie est utilisée vivante (B),
- L'autre partie est utilisée après chauffage de 2 heures au bain-marie à 100°C (O).

Ces deux suspensions sont diluées au 1/2 en eau physiologique, de manière à obtenir une densité optique correspondant environ à 5.108 de bactéries par ml.

Pour le titrage de la suspension de bactéries vivantes, les dilutions de sérum sont échelonnées de 1/100 à 1/800 et pour celui de la suspension chauffée de 1/100 à 1/6400.

- Centrifuger 5 minutes à 3000 tours/minutes environ (le surnageant doit être limpide).
- Remettre le culot en suspension par une chiquenaude sur le fond du tube : Si la suspension redevient homogène, le résultat est négatif. Dans le cas contraire, on observe des agglutinats visibles à l'oeil nu = résultat positif.

Résultats

Les titres d'agglutination sont :

- Pour la suspension vivante : au minimum de 1/200 et en général de 1/400.
- Pour la suspension chauffée : au minimum de 1/600 et, en général, de 1/3200.

CONSERVATION / VALIDITE / LOT

- Prêt à l'emploi : à + 2 - 8°C
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.