Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière

Direction de la Prévention

Techniques Microbiologiques

Diagnostic Bactériologique et Sérologique de la Diphtérie

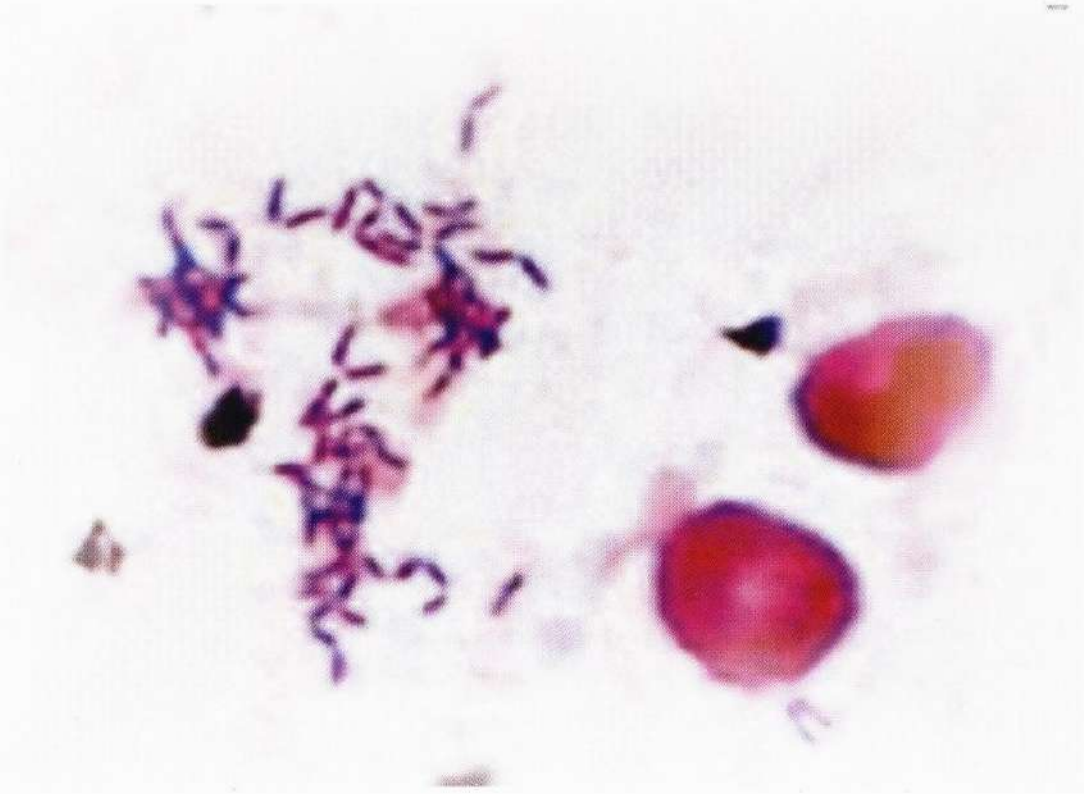
2007

Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière

Direction de la prévention

Techniques Microbiologiques

Diagnostic Bactériologique et Sérologique de la Diphtérie



2007

Diagnostic Bactériologique et Sérologique de la Diphtérie

AZOUAOU M.
LAZRI M.
MAHRANE S.
SENOUCI H.
RAHAL K.

Déjà parus dans la collection Techniques Microbiologiques:

- **MN OUAR-KORICHI- H SENOUCI- K RAHAL.**
  Diagnostic bactériologique et sérologique de la brucellose. ANDS 1998. 33 pages
- **R BELOUNI -H TALI-MAAMAR- K RAHAL**
  Etude cytobactériologique et biochimique du liquide céphalo-rachidien. ANDS 2000. 52 pages.
- **A BENSLIMANI- K RAHAL**
  Prélèvements génitaux. ANDS 2001. 128 pages.
- **AS MERAD - H TALI-MAAMAR- K RAHAL.**
  Diagnostic bactériologique et antibiothérapie des infections oculaires. ANDS 2003. 40 pages.
- **MN OUAR-KORICHI- H SENOUCI- K RAHAL.**
  Diagnostic bactériologique et sérologique de la brucellose. ANDS 2005. 57 pages. 2ème édition
- **N RAMDANI -BOUGUESSA - K RAHAL**
  Diagnostic bactériologique des infections Broncho-Pulmonaires. ANDS 2005 54 pages

Sommaire

I- INTRODUCTION

La *DIPHTERIE* est ***« une intoxication causée par un poison très actif formé par le microbe, et l'infection n'est pas produite par un microbe envahissant mais par la diffusion dans l'organisme d'une substance toxique préparée »*** c'est par cette définition que Roux et Yersin expliquèrent cette maladie infectieuse. En effet il s'agit d'une toxi-infection bactérienne due au « bacille de Klebs Loeffler » le ***Corynebacterium diphteriae***, connue depuis l'antiquité pour sa contagiosité et sa gravité, qui fut isolé la première fois en 1884 par Friedrich Loeffler.

C'est une maladie à déclaration obligatoire strictement humaine (MDO n°6), qui constitue un problème de santé publique (maladie réémergente).

Elle existe à l'état endémique en Algérie, elle constitue une urgence diagnostic et thérapeutique

II- EPIDEMIOLOGIE

La diphtérie est une maladie strictement humaine ; l'habitat naturel du *Corynebacterium diphtheriae* est dans les voies aériennes supérieures : le rhinopharynx.

Sa transmission est assurée par les gouttelettes de pfluge émises en parlant, toussant, ou éternuant et ceci constitue le mode de contamination direct. Plus rarement la transmission est indirecte à partir d'objets (literie, livre) du fait de la résistance du bacille dans le milieu extérieur.

Il existe une voie de contamination cutanée, qui dans certaines régions du monde (Ouganda) est, le mode d'expression le plus fréquent de la maladie. Le portage nasophryngé se voit triplé lorsqu'il existe des cas de diphtérie cutanée et pourrait représenter le principal facteur de contagion en assurant en même temps la propagation du *Corynebacterium diphtheriae* dans la population.

La diffusion de la maladie est due aux malades, convalescents (le portage dure environ deux semaines en l'absence de traitement) et porteurs sains (le portage est possible pendant plusieurs semaines ou mois) ; ces derniers représentent 98% des sources d'infections.

L'immunité induite par la maladie est médiée par les anticorps, elle est dirigée essentiellement contre la toxine ; les anticorps sont de type IgG. Cette antitoxine circule à travers tout l'organisme et passe la barrière placentaire procurant ainsi une immunité passive au nouveau né durant les premiers mois de sa vie.

L'antitoxine peut être induite soit directement par la toxine diphtérique produite par *Corynebacterium diphtheriae* chez le malade et le porteur sain, soit par la vaccination avec l'anatoxine diphtérique.

L'immunité produite après la maladie n'est pas totale, et il est recommandé de vacciner les convalescents car la maladie immunise mal du faite que les anticorps antibactériens sont spécifiques de la souche incriminée, mais comme il existe de nombreux variants séroypiques, l'immunité ne peut être totale.

La dose et la virulence du bacille ainsi que l'état immunitaire du sujet infecté influencent également la sensibilité à la maladie.

Ainsi, on considère qu'une concentration d'anticorps de 0,01à0 ,09 UI /ml assure une immunité relative, tandis qu'un titre plus élevé assure une protection totale.

D'après des études réalisées à l'aide de techniques de neutralisation chez l'animal et sur cultures cellulaires ,le taux protecteur serait de 0,1UI/ml (Cellesi et al 1989a, Galazka & kardymowicz); ce taux d'antitoxine correspond à un test de Schick négatif (voir partie sérologie).

Avant l'ère de la vaccination, lorsque la présence de *Corynebacterium diphtheriae* était importante, l'immunité naturelle acquise lors des formes apparentes ou non apparentes de l'infection était la seule source de protection ; tous les sujets entre 15 et 20 ans avaient acquis une immunité naturelle envers la maladie.

Apres l'application des programmes de vaccination, on note une réduction considérable de l'incidence de la maladie, et également une modification du statut immunitaire des différentes tranches d'âges.
La vaccination du jeune enfant lui permet d'acquérir une forte immunité envers la maladie ; cette immunité décroît chez l'enfant plus âgé et l'adolescent en fonction du schéma de vaccination et de l'incidence de la diphtérie.

Une immunité élevée chez l'enfant entraîne une diminution de la fréquence de la maladie ; la diphtérie devenant rare, les occasions d'acquérir ou de renforcer l'immunité naturelle sont aussi réduites, ceci pourrait entraîner une sensibilité accrue chez les adultes. Le taux d'anticorps diminue avec l'âge, moins de 50% des adultes possèderaient une immunité antidiphtérique ; d'où la nécessité de faire des rappels de vaccinations.

Les tranches d'âges à risque varient en fonction des pays et des épidémies qui les ont touchés : ainsi, en Allemagne c'est la tranche de 20 à 40ans qui est le plus exposée ainsi que dans les différentes régions de l'ex-URSS.

La diphtérie dans le monde :

C'est une maladie qui évolue par cycles qui comportent des périodes épidémiques suivies de disparitions pendant une durée de100ans ou plus.

Au XVI et XVII siècle : épidémie en Espagne ; d'autres vagues épidémiques sont rapportées en 1583, 1613,1630, 1645, et 1666.

Une autre bouffée épidémique a touché les USA entre 1735 et 1740.
Au XIX siècle : l'Amérique et l'Europe ont connu une grande épidémie entre 1847 et la fin du siècle. La mortalité liée à la diphtérie atteignait 50 à 100/100000 habitants avec un taux de létalité proche de 50%.

Une autre épidémie touche l'Europe pendant la seconde guerre mondiale avec une incidence supérieure à 200/100000 hab. Il y a eu 50000 morts et plus de 1 million de cas en Europe.

Avec l'introduction de la vaccination entre 1945 et 1950 dans les pays industrialisés, elle s'est accompagnée d'une diminution spectaculaire de l'incidence.

Depuis 1976 l'incidence a augmenté en Ex-URSS atteignant un premier pic entre 1983-1985 avec un nombre de cas annuel de 1400. Une seconde vague épidémique a débuté vers 1990 : en 1994 les 12 états étaient touchés. On est passé de 1436 cas en 1990 à 19604 cas en 1993 puis à 47869 cas en 1994 pour atteindre 50434 cas en 1995. Depuis on note une baisse de l'incidence avec 30 cas en 2001 et une incidence de 0,57 pour 100000hab.

Pour l'union européenne : en ***Finlande*** on a signalé un cas importé en 30 ans pour l'année 1993.

En France on a recensé un seul cas en 2002 et ceci en 13 ans.
En 4 ans en Italie, il y a eu un seul cas en 2002.

La Lettonie présente le taux d'incidence le plus élevé de tous les états membres de l'ex URSS ou on a enregistré entre 1993 et 2001 : 1288 cas déclarés dont 96 décès.

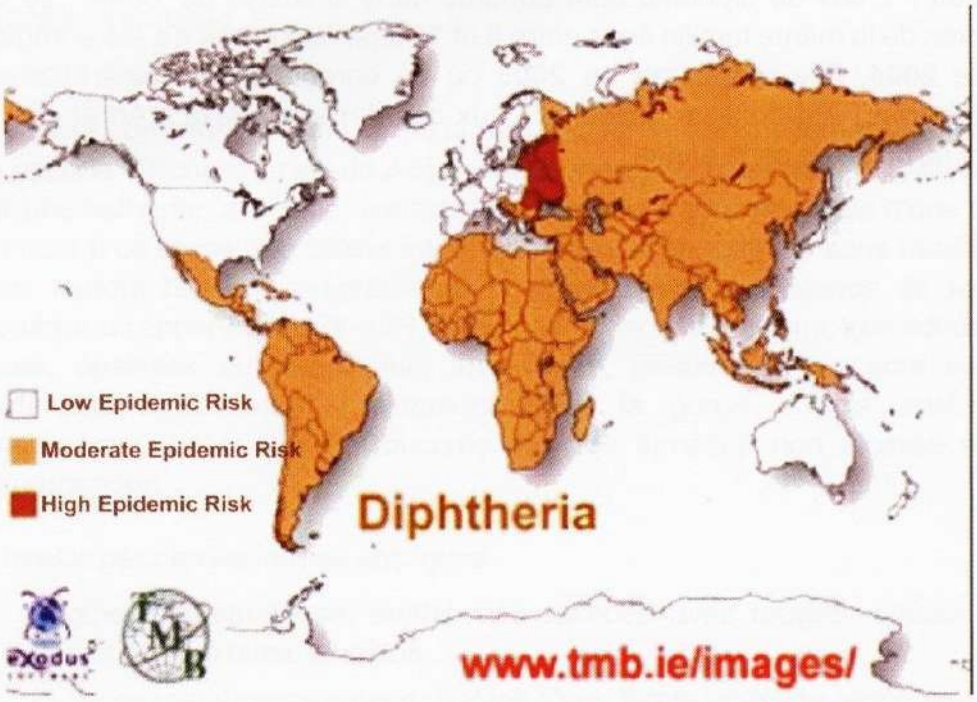
Dans les pays en développement, après l'introduction des programmes de vaccination sous l'égide de l'OMS dans les années 1970, la couverture vaccinale des enfants est passée de 5% en 1974 à 46% en 1985 et 79% en 1992.

Au Yémen une épidémie de 150 cas a eu lieu entre 1982 à 1983 avec un taux de létalité de 14%.

En Jordanie deux épidémies sont survenues en 1977 et 1978 puis en 1982-1983.

Au Soudan une épidémie de 107 cas en 1978, il y a eu une autre épidémie en 1988.

Toutes ces épidémies évoluent de la même manière : elles touchent d'abord les jeunes enfants, lorsque la couverture vaccinale des enfants augmente elle affecte les adolescents puis les adultes.



www.microbes-edu.org

La diphtérie en Algérie :

Après l'introduction de la vaccination dans les années 50, l'incidence de la diphtérie a régulièrement baissé dans le monde, l'Algérie a connu le même sort. Il a été noté une diminution de 55% de morbidité entre les périodes 1963-1969 avec une incidence de 3,97 pour 100000 hab. et une incidence de 1,87 pour 100000 hab. entre 1970-1979. Mais depuis 1990 une recrudescence de la maladie a été enregistrée. Les cas décrits jusque là étaient le plus souvent sporadiques, localisés au sud du pays.

En 1992 dans la wilaya d'Adrar 23 cas ont été signalés, suivis de trois flambées épidémiques en 1993, 1994,1995 touchant différentes régions du pays (El Oued, Bejaia, Tizi Ouzou, Adrar, Djelfa, Batna, Setif, Tipaza).

Il y a eu 296 cas en 1993
972 cas en 1994
361 cas en 1995

L'incidence de la maladie a baissé en 1996 avec un taux de 0,59/100000 hab. Elle passe **en 1997** à 0,21/100000 hab. On dénombre 62 cas avec 6 décès ; ce sont les 0 à 4 ans et les 10 à 19 ans ou on observe les taux les plus élevés.

En 1998 l'incidence de la maladie a encore baissé pour passer 0,19/100000 hab. soit 57 cas confirmés : on déplore 12 décès ce sont toujours les 5 à 9 ans qui sont touchés ainsi que les 20 à 29 ans. Pour l'année **1999** une baisse importante du nombre de cas : 17 cas avec un taux de létalité en légère augmentation avec 23,5%.

Pour chacune des années **2000 et 2001**, on déplore 3 cas et un décès.

Aucun cas de diphtérie n'a été enregistré au cours de l'année **2002**.

En 2003 : 7 cas de diphtérie sont apparus dans la wilaya de Tiaret ; se sont des membres de la même famille âgés entre 5 et 14 ans. Aucun cas n'a été enregistré pour l'année **2004**. Elle réapparaît **en 2005** où on enregistre un cas à Illizi, 5 cas à Chelghoum El Aïd dont un décès, et deux cas dans la wilaya d'Adrar où elle sévit encore au cours de cette année.

III- Rappel physiopathologique

1- Pénétration : *C.diphteriae* pénètre dans l'organisme le plus souvent au niveau des voies aériennes, se multiplie préférentiellement dans les couches superficielles de certains épithéliums comme le rhinopharynx, plus rarement le larynx ou la peau, cela n'empêche pas la possibilité de l'isoler des conjonctives, des sécrétions vaginales ou d'autres liquides biologiques

La bactérie en se multipliant localement, va provoquer une réaction inflammatoire avec formation d'un exsudat épais (fausses membranes) accompagné d'adénopathies satellites.

De plus, la toxine produite et transportée par le sang va être responsable des complications. En effet, *C.diphteriae* possède un double pouvoir pathogène : l'un est invasif, l'autre toxique

2- Pouvoir pathogène local : qui est dû à la multiplication et à la virulence de *C.diphteriae*, en effet en plus des constituants protéiques et lipidiques (Ag K, Cord factor), la toxine exerce un effet cytotoxique qui va entraîner une réaction inflammatoire locale

3- Pouvoir pathogène à distance : est dû à l'action de la toxine diffusée qui est de type pantrope ne possédant pas d'affinité pour un organe en particulier. En effet, la toxine véhiculée par le sang, atteint différents organes au niveau desquels elle va agir en bloquant la synthèse protéique, ce qui explique les nombreuses complications provoquées (neurologique, cardiaque, rénale...).

4- Formes cliniques :

Angines diphtériques

• **<u>Angine commune</u> :** est la forme la plus fréquente, habituellement rencontrée. La période d'incubation est de 2-5j, suivie d'une période d'invasion caractérisée par une asthénie, anorexie, courbatures, rarement accompagnée d'une fièvre. On note à ce stade une pâleur importante, des adénopathies sous-maxillaires, mais surtout l'aspect rougeâtre de la gorge avec la présence de fausses membranes apparues en 24-48H, de couleur blanchâtre, crème, très adhérentes lisses, épaisses au début puis irrégulières, grisâtres, elles sont souvent bilatérales, envahissant rapidement toute la gorge, même après leur arrachement. La muqueuse buccale est peu tuméfiée non ulcérée et non hémorragique.

Il existe parfois des formes atypiques :

- Angine érythémateuse, erythémato-pultacée avec rougeur diffuse et un enduit pultacé blanc jaunâtre
- Fausses membranes seules : il s'agit d'une forme atténuée rencontrée chez le vacciné

- Forme pseudophlegmoneuse avec œdème, tuméfaction d'une amygdale

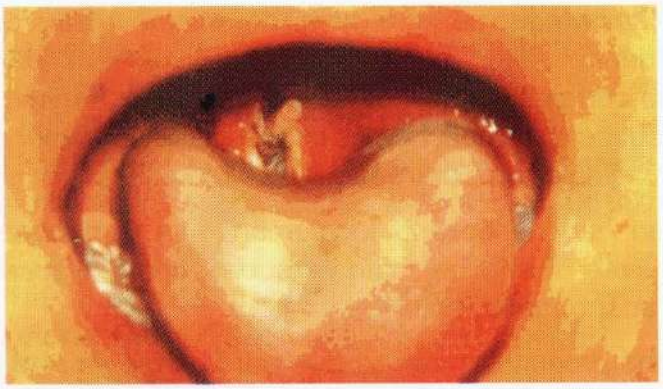


Photo 1: Angine diphtérique
www.annedecoster.fr

- **Angine maligne** : dite « forme hyper toxique », rencontrée dans 17 à 23% des cas, alors que dans les zones tempérées elle n'est que de 1-2%, se voit rarement en dehors des épidémies, peut s'installer directement avec des signes de malignité, comme elle peut se voir secondairement à une angine commune mal ou non traitée.

  Elle est caractérisée par une fièvre à 39-40°C (il existe des cas apyrétiques), une altération de l'état général, une adynamie ou une agitation, une pâleur intense et une déshydratation surtout chez le nourrisson.

  On note aussi : une tachycardie, hypotension artérielle, extrémités froides et cyanosées, diarrhées, vomissements avec purpura au niveau du cou et du thorax, des adénopathies bilatérales volumineuses et douloureuses.

  Dans l'angine maligne, les fausses membranes sont de couleur grisâtre, gris verdâtre ou noirâtre parfois hémorragiques et fétides, reposant sur une muqueuse œdémateuse, ulcérée et hémorragique, se détachant très difficilement, ce qui engendre une dysphonie et une dysphagie, la bouche reste entre ouverte avec une hypersialorrhée et une haleine fétide en plus d'une rhinite hémorragique.

  L'évolution est le plus souvent mortelle même après une sérothérapie.

Croup = Laryngite diphtérique

Il s'agit souvent de l'évolution d'une angine diphtérique (commune ou maligne) touche surtout l'enfant de 2-6 ans, avec une fréquence de 45-75% dans les pays endémiques, 10-15% en Europe. Il est de mauvais pronostic avec une mortalité de 25-71%. Se caractérise par une modification de la voix et de la toux, ainsi au début la voix et la toux sont rauques puis la voix devient éteinte avec une toux toujours rauque et ensuite la voix et la toux toutes deux sont éteintes.

En l'absence de traitement, la phase dyspnéique (bradypnée, sueur, convulsions, angoisse) s'installe de façon intermittente puis continue, elle sera suivie par la phase d'asphyxie, la mort s'ensuivra en quelques heures.

Rhinite diphtérique = Diphtérie nasale

Forme fréquente chez le nourrisson et l'enfant de 2-6 ans, rare chez l'adulte, souvent associée à une angine diphtérique (60% des cas).

Se caractérise par un écoulement uni puis bilatéral, séreux ou mucopurulent ou encore hémorragique parfois même fétide. La muqueuse nasale présente des érosions plus au moins profondes pouvant saigner au contact avec parfois la présence de fausses membranes blanchâtres.

Cliniquement, l'état général est bien conservé, parfois on peut observer une anorexie avec diarrhée, vomissements, légère fièvre, pâleur mais surtout une gêne respiratoire.

Des localisations secondaires peuvent être associées ex. otite, conjonctivite...alors que la myocardite et les paralysies sont rares.

Lorsqu'elle n'est pas associée à une angine, la rhinite peut guérir sans traitement au bout de 10 à 15j.

Diphtérie cutanée

Elle est surtout primitive, isolée, se développant sur des lésions préexistantes (brûlures, mycose, circoncision....).

Les signes généraux restent modérés avec une légère fièvre, courbatures, asthénie peu prononcée alors que dans certains cas une adynamie, pâleur extrême, fièvre, tachycardie, adénopathie (selon la localisation) sont observées. L'évolution est souvent simple, quelque fois, il y a surinfection par des germes anaérobies donnant à la lésion un aspect nécrotique et gangréneux, les complications surviennent dans 30-40% des cas.

Les formes rencontrées sont :

- **Ulcération cutanée** : au début peu étendue, peu profonde avec une sérosité abondante et jaunâtre, très rapidement elle se recouvre de fausses membranes grisâtres ou jaune brunâtre épaisses, suintantes et adhérentes ; elle peut devenir profonde sans jamais atteindre le muscle.
- **Diphtérie ombilicale** : rencontrée chez le nouveau-né, la fausse membrane est cartonnée, mince, adhérente, qui tombera spontanément en 2 à 3 semaines
- **Vulvo-vaginite diphtérique**
- **Conjonctivite diphtérique** : souvent secondaire à une localisation nasale ou pharyngée, peut être uni- ou bilatérale avec des fausses

membranes grisâtres, peu épaisses sur une muqueuse rouge parfois ulcérée, évoluant rapidement vers la guérison. Des formes graves type érosion cornéenne, kératite peuvent être observées

- **Otite diphtérique** : souvent associée à une angine ou une rhinite, chez le nourrisson avec otalgie

Complications

a) **Myocardite** : est la complication majeure apparaissant suite à une angine diphtérique tardivement traitée, débutant souvent précocement entre le 5 et 10^{ème}j (dans 80% des cas), comme elle peut être tardive (plus de 3 semaines).

Cliniquement, on note un trouble du rythme, une cyanose, une hépatomégalie douloureuse, une oligurie et une hypotension.

Biologiquement : l'augmentation des enzymes cardiaques, transaminases est à signaler.

Nb : Deux cas d'endocardites à *C.diphteriae* ont été diagnostiqués au CHU de Béni-Messous (Dr Touati).

b) **Paralysies** : décrites dans le «syndrome malin tardif de Grenet et Menart » dont l'apparition peut aller du 5ème jour jusqu'au 90ème jour, elles sont rencontrées dans 12-21% des cas, il peut s'agir de la paralysie :

- vélopalatine avec nasonnement, reflux des liquides par le nez
- de l'accommodation : gêne de la vision rapprochée
- des muscles : touchant d'abord les membres inférieurs, puis les muscles respiratoires et oesophagiens.

c) **Autres atteintes neurologiques** : sont exceptionnelles, avec l'encéphalite (5% des cas), l'hémiplégie (1% des cas)

d) **Atteinte rénale** : rencontrée souvent dans les angines malignes, se manifestant par une oligo-anurie, hématurie, hyperazotémie, protéinurie importante.

IV- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE

1- Prélèvements :

L'écouvillonnage réalisé au niveau de la gorge, du nez ou du rhinopharynx à l'aide d'un écouvillon est le principal prélèvement.

- Prélèvement de la pseudomembrane à l'aide d'une pince, qui sera mise dans une boîte stérile ou à défaut un tube stérile.
- Aspiration ou écouvillonnage à la base de la lésion après avoir éliminé la croûte
- Autres : des hémocultures sont éventuellement réalisées en cas de complications.

- Acheminement au laboratoire :

Les prélèvements doivent être expédiés immédiatement au laboratoire à température ambiante, accompagnés d'une fiche de renseignements (annexe). Il est possible d'ensemencer des tubes de Loeffler qui peuvent servir de milieux de transport (annexe). Il faut absolument prévenir à l'avance le laboratoire auquel on expédie les prélèvements pour une prise en charge adéquate.

2- Diagnostic direct :

a- Traitement du prélèvement :

Réalisation du frottis coloré : sur une lame propre et dégraissée, confectionner un frottis en exprimant le contenu de l'écouvillon au centre de la lame, puis à l'aide d'une anse de platine réaliser des mouvements centrifuges++, laisser sécher puis fixer à la flamme ou à l'alcool.

Par la suite, des colorations type Gram, Del Vecchio (annexe) peuvent être réalisées.

a.1- Morphologie :

Comme les autres *Corynebacterium*, *C.diphtheriae* est un bacille à Gram positif, possédant une disposition particulière en lettres (L,N,X), chiffres romains, groupés en palissades, il s'agit de bâtonnets fins (0,3-0,8 µm de diamètre) droits ou longs, incurvés, non sporulés, non capsulés. Lorsque le frottis est réalisé à partir d'une culture, l'aspect est polymorphe avec un gonflement aux extrémités, en massues.

Coloration de Gram : basée sur la différence de composition chimique des parois bactériennes, elle révèle l'absence ou la présence de la couche lipidique et renseigne sur la perméabilité ou non de la paroi à l'alcool.

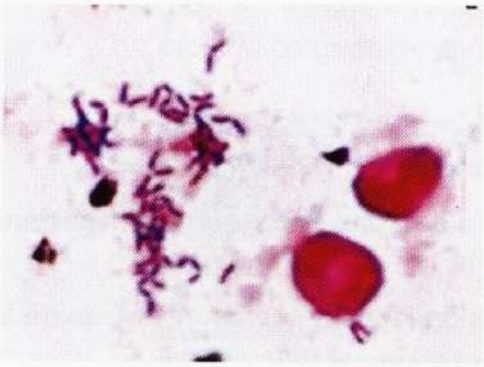


Photo n° 2 : Coloration de Gram à partir d'un prélèvement de gorge

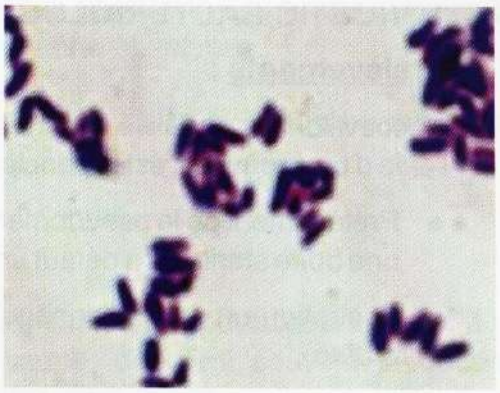


Photo n°3 : Coloration de Gram à partir d'une culture bactérienne

www.microbes-edu.org

Les Corynébactéries sont des bactéries à Gram positif et apparaissent bien colorées en violet, les tailles sont variables selon le biotype :

Biotype mitis : Bacilles longs.

Biotype gravis : Bacilles courts.

a.2- Culture :

Arrivés au laboratoire et après enregistrement, les prélèvements seront ensemencés sur gélose au sang. La recherche des corynébactéries sur les prélèvement polymicrobiens peut être facilitée en déposant sur la gélose au sang un disque de fosfomycine à 300µg ou à défaut à 50µg dans la zone ensemencée : les corynébactéries se développent dans la zone de diffusion de l'antibiotique alors que beaucoup d'autres bactéries sont inhibées par cet antibiotique.

L'utilisation du milieu de Loeffler sérum de bœuf permet d'obtenir une croissance rapide de *C diphtheriae* (14h à 18h).

Corynebacterium diphtheriae est un germe aéro-anaérobie facultatif, les cultures sont incubées 18h à 24h dans une atmosphère normale à 35 ° C.

Le milieu de Tinsdale peut être utilisé pour la recherche de *C diphtheriae*, l'incubation de ce milieu est de 48h à 72h. La présence de *Corynebacterium diphtheriae* se traduit par la présence de colonies de couleur noire (réduction du tellurite de potassium, contenu dans le milieu, en tellurite), entourées d'un halo brun foncé (indiquant une production d'H2S à partir de L-cystine par une cystinase). Ce type de colonies est indicatif de *C. diphtheriae* mais pas spécifique (les trois biotypes ont le même aspect), d'autres bactéries peuvent produire ce type de colonies (certains *Staphylococcus spp* ainsi que

Corynebacterium ulcerans et plus rarement, certaines souches de *C. pseudotuberculosis*), d'ou la nécessité de faire un examen microscopique des colonies, et une identification complète dans le cas ou l'examen microscopique révèle des bacilles à Gram positif (2).

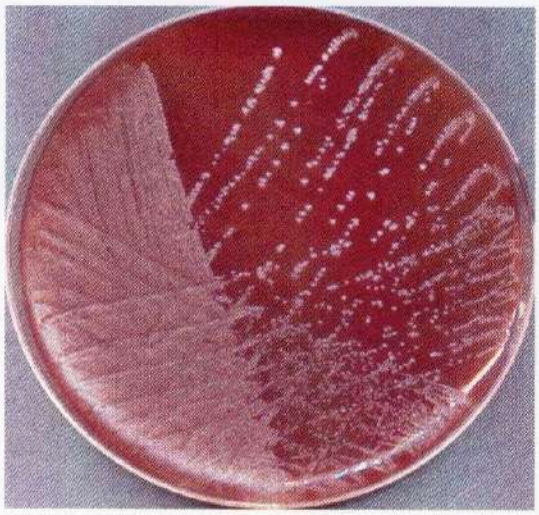


Photo n°4 : Culture sur gélose au sang frais (GSF)

Photo n°5 : Culture sur milieu de Tinsdale

b- Identification biochimique :

Les bactéries corynéformes se développant avec un halo sur le milieu de Tinsdale évoquent une forte suspicion de *Corynebacterium diphtheriae* ; on recherchera alors : hémolyse (gélose au sang frais), catalase, nitrate réductase, gélatinase, uréase, esculine, galactosidase, glucuronidase, phosphatase alcaline, pyrrolidonyl aminopeptidase, ou arylamidase, pyrazinamidase et l'activité glucidolytique : glucose, maltose, saccharose, mannitol et xylose (tableau n°:1).

Tableau n° I : Identification biochimique des différents biotypes de *C. diphtheriae*

Espèces	NIT	PYZ	Pyr A	PAL	β GUR	β GAL	αGLU	β NAG	ESC	URE	GEL	GLU	RIB	XYL	MAN	MAL	LAC	SAC	GLYC	CAT
C. diphtheriae mitis	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	
C. diphtheriae gravis	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	
C. diphtheriae belfanti	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	

Nit : nitrate, PYZ : pyrazinamidase, PYRA : pyrrolidonyl arylamidase, PAL : phosphatase alcaline, GUR : bêta glucuronidase, GAL : bêta galactosidase, GLU : alpha glucosidase, NAG : N-acetyl, glucosaminidase, ESC : esculine, URE : uréase, GEL : gélatine, GLU : glucose, RIB : ribose, XYL : xylose, MAN : mannitol, MAL : maltose, LAC : lactose, SAC : saccharose, GLYC : glycogène, CAT : catalase

b.1- Galerie classique :

A partir d'une culture pure, faire une suspension laiteuse (6 Mac Farland) et effectuer la galerie d'identification suivante :

- Gram
- Recherche de la catalase
- Recherche de la nitrate réductase (10 gouttes de suspension)
- Recherche de l'uréase sur milieu de Christensen (ensemencement en stries serrées de la partie supérieure de la gélose, le culot servant de témoin).
- Recherche de l'indole, sur eau peptonée exempte d'indole (10 gouttes de suspension)
- Recherche de la gélatinase (un film de gélatine dans 1 ml de suspension bactérienne)
- Etude de la fermentation des sucres : elle se fait sur milieu CTA (Cystine Trypticase Agar) ou sur milieu MEVAG sans sucre, additionnés de 10 % de sérum de cheval et de 1 % d'hydrate de carbone ajoutés stérilement.

  Les sucres étudiés sont : le glucose, le maltose, le ribose et le glycogène.

  Inoculer en piqûre la partie supérieure du milieu d'étude de ces sucres (bouchon légèrement dévissé).

  *** Incuber la galerie pendant 24h à 35°C

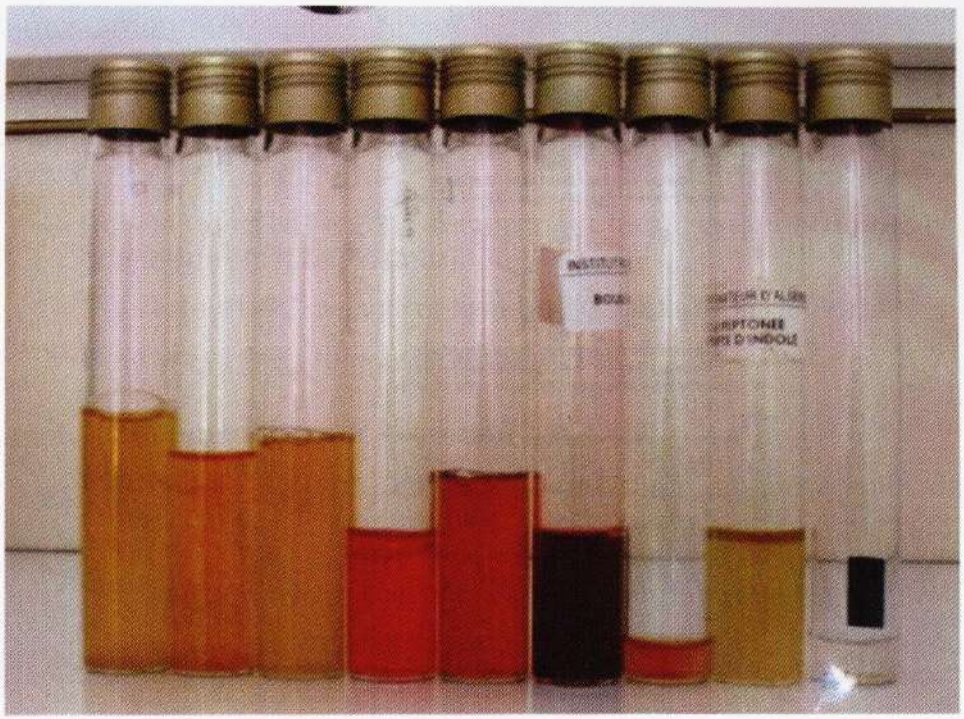


Photo n° 6 : Galerie classique

De gauche à droite : Glucose, ribose, maltose, glycogène, témoin négatif, bouillon nitrate, urée, eau peptonée, gélatine

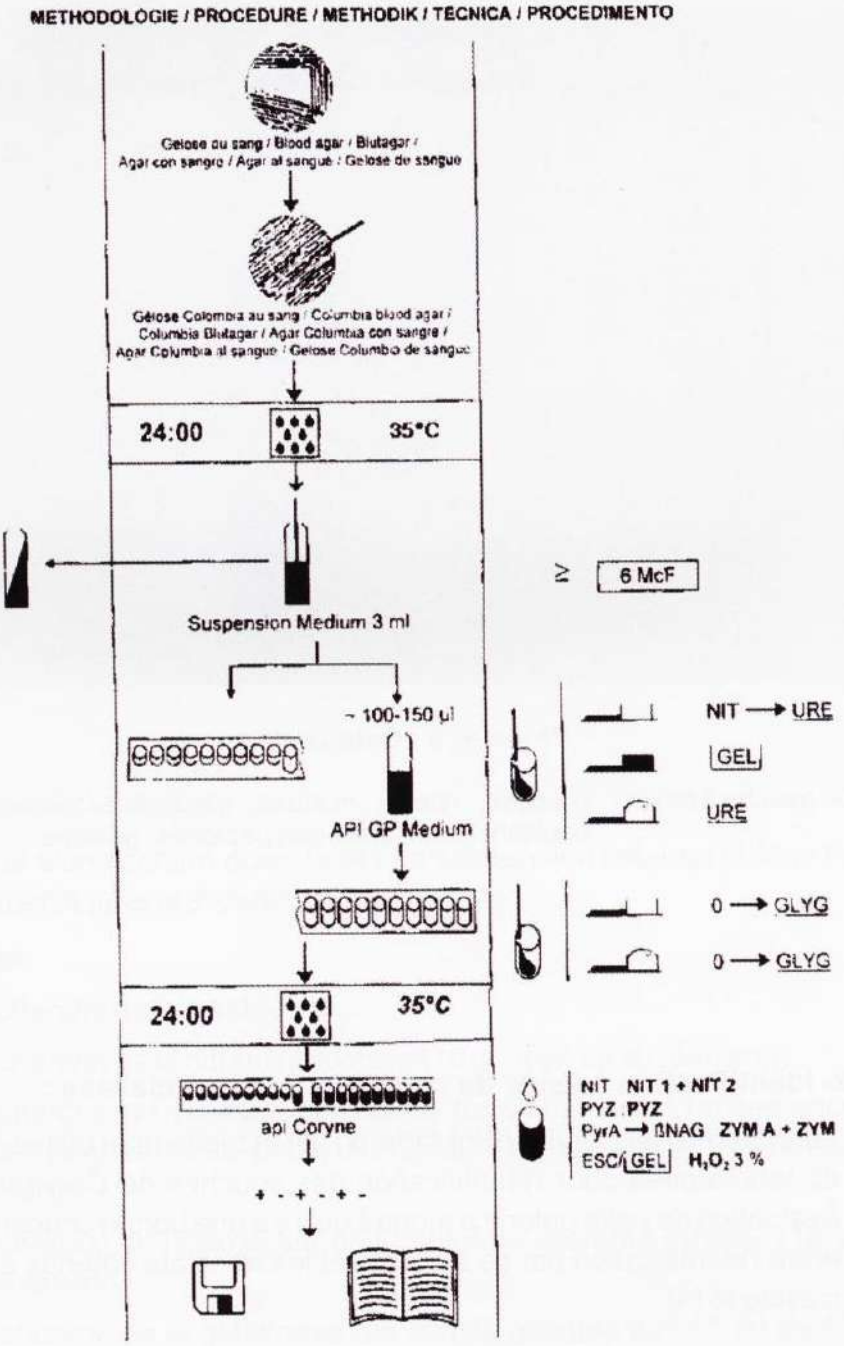
b.2- Identification à l'aide de systèmes commercialisés :

Le système Api Coryne (BioMérieux) est actuellement utilisé dans beaucoup de laboratoires pour l'identification des souches de *Corynebacterium*. Une évaluation de cette galerie a montré qu'il y a une bonne concordance (97.6 %) entre l'identification par ce système et les résultats obtenus avec le système classique (4).

Principe :

La galerie Apri Coryne comprend 20 microcupules contenant des substrats sous forme déshydratée pour la fermentation des sucres.

Technique (voir schéma fourni par BioMerieux).



a- <u>Préparation de l'inoculum</u> :

- Ouvrir une ampoule de suspension médium
- A l'aide d'un écouvillon stérile, prélever toute la culture préalablement préparée en milieu gélosé et réaliser une suspension dont l'opacité ne doit pas être inférieure à celle de l'étalon 6 de Mc Farland en comparant au témoin d'opacité présent dans le coffret.

b- Inoculation de la galerie :

▪Onze premiers tests de la galeries (NIT à GEL) : répartir la suspension précédente en évitant la formation de bulles (incliner la boite d'inoculation vers l'avant).

- Pour les tests NIT à ESC, ensemencer 150µl dans chaque cupule (soit 03 gouttes de pipettes Pasteur).
- Pour le test URE, remplir uniquement la partie tube.
- Pour le test GEL, remplir toute la cupule

▪ Neuf derniers tests de la galerie (0 à GLYG).

- Transférer environ 0.5 ml de la suspension précédente dans une ampoule de GP médium, bien homogénéiser.

▪ Répartir cette nouvelle suspension dans les tubes uniquement.

- Recouvrir les tests soulignés d'huile de paraffine.
- Refermer la boite.
- Incuber 24 heures à 35-37 ° C (5).

Lecture : (voir Tableau en annexe)

Coder l'ensemble des réactions obtenues en un profil numérique après avoir reporté tous les résultats sur la fiche d'identification, se référer ensuite au catalogue analytique Api Coryne fourni par Biomerieux.

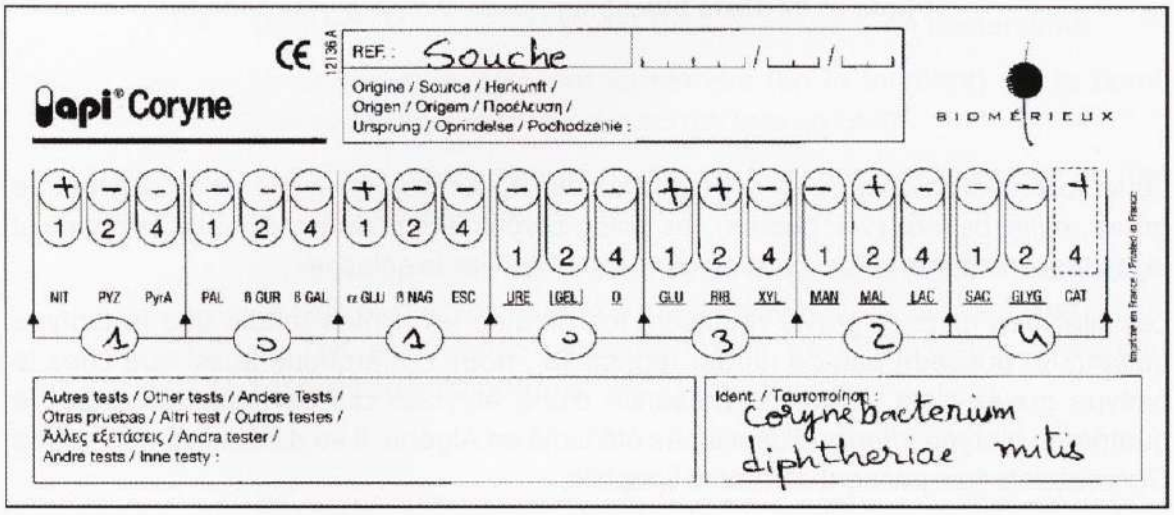


Photo n° 7 : Test biochimiques de *C. diphtheriae gravis*

Photo n° 8 : Tests biochimiques de *C.diphtheriae mitis*

Photo n° 9 : Tests biochimiques de *C.diphtheriae belfanti*

La lecture des galeries nous a permis de distinguer trois biotypes de *C.diphtheriae gravis, mitis, belfanti* (voir photos), les trois biotypes fermentent le glucose, le ribose et le maltose, ne dégradent pas l'urée et ne liquéfient pas la gélatine.

Les biotypes *mitis* et *gravis* réduisent les nitrates en nitrites tandis que le biotype *belfanti* ne possède pas de nitrate réductase ; nous remarquons aussi que chez le biotype gravis c'est surtout la présence d'une amylase qui est caractéristique, le quatrième biotype *intermedius* n'a pas été isolé en Algérie, il se différencie des autres *Corynebacterium* par sont caractère lipophile.

3- Antibiogramme :

C.diphtheriae est l'une des corynébactéries les plus sensibles aux antibiotiques, cependant la réalisation systématique d'un antibiogramme est indispensable pour la détection de résistances et le suivi de l'évolution des résistances aux antibiotiques (17)

Technique :

Milieu :

- Gélose Mueller-Hinton coulée en boîtes de pétri sur une épaisseur de 4 mm
- Les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement (gélose au sang ou milieu de Tinsdale), racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 %
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland où à une D O de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm.
- L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop important.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum

Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

- Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre.
- Les antibiotiques testées sont : Pénicilline (10UI), ampicilline (10µg), streptomycine (10µg), gentamicine (10µg), amikacine (30µg), ofloxacine (5µg), érythromycine (15µg), Pristinamycine (15µg), Doxycycline (30µg), vancomycine (30µg) chloramphénicol (30µg), trimetoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75µg).
- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince pour s'assurer de son application. Une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.
- La souche *C diphtheriae* ATCC 100721 est utilisée comme contrôle de qualité pour la réalisation des antibiogrammes.

Incubation :

- 24 heures à 35°C

Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boite fermée (7).

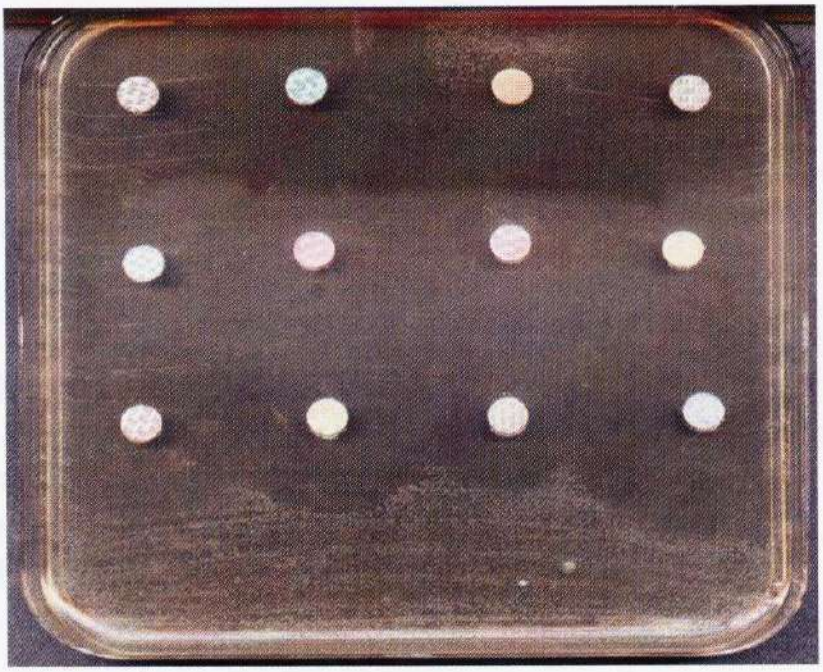


Photo 10 : antibiogramme d'une souche de *C.diphtheriae*

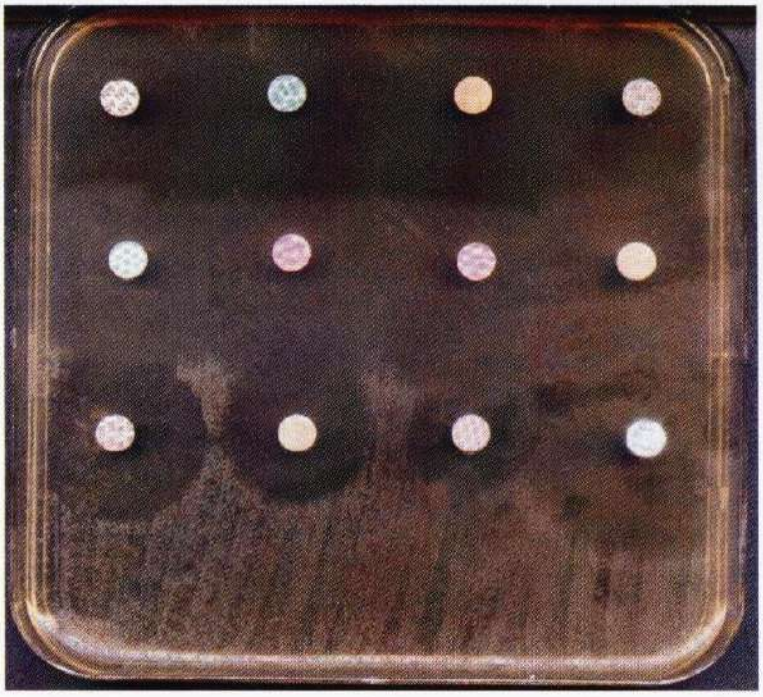


Photo 11 : antibiogramme de l'ATCC 100721

4- Etude des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par dilution sur milieu gélosé et par E test :

a- CMI :

1- Préparation de la solution mère :

On prépare une solution mère à 1600µg/ml = 16 mg de poudre diluée par 10 ml de solvant.

Pour les poudres d'antibiotiques titrée, calculer le volume de solvant à rajouter comme suit :

$$V = \frac{16mg \times titre}{1600\mu g/ml} = ml\ H_2O\ diluée$$

Tableau n°2 : Préparation de la gamme de dilution de l'antibiotique

Solution mère d'antibiotique	Solution mère (ml)	Eau distillée	Concentration des tubes (µg/ml)	Concentration des boites (µg/ml)
1600µg/ml	1	9	160	16
	0.5	9.5	80	8
80µg/ml	2	2	40	4
	1	3	20	2
	0.5	3.5	10	1
	0.5	7.5	5	0.5
5µg/ml	2	2	2.5	0.25
	1	3	1.25	0.125
	0.5	3.5	0.63	0.063
	0.5	7.5	0.32	0.032
0.32	2	2	0.16	0.016

Matériel :

- Série de 11 tubes à essai, numérotés de 160µg/ml à 0.16µg/ml.
- Série de boîtes de Pétri rondes, numérotées de 16µg/ml à 0.016µg/ml
- Culture de 18h de la souche a tester, ainsi que la souche témoin *C.diphtheriae* ATCC 100721

Méthode :

- Préparation de la gamme d'antibiotiques comme décrit dans le tableau
  - Commencer par la distribution d'eau distillée dans chaque tube
  - A partir de la solution mère, procéder à la distribution de l'antibiotique en changeant de pipette chaque fois que c'est nécessaire.
  - Prendre 2 ml de chaque concentration en tube de l'antibiotique (160µg/ml, 80µg/ml, 0.16µg/ml) et la mettre dans les boîtes de Pétri correspondantes à la concentration (16µg/ml à 0.016µg/ml).
  - Pour chaque série de CMI préparer une boîte témoin avec 2ml d'eau distillée sans antibiotique pour le contrôle de l'inoculum.
  - Ajouter 18 ml de Mueller Hinton fondu et ramené à 45 °C.
  - Réaliser des mouvements rotatoires pour homogénéiser le contenu de la boîte et laisser solidifier
  - Sécher les boîtes.

- Inoculum :

  Préparer les suspensions des souches à tester et de la souche témoin de la même manière que pour l'antibiogramme (0.5 Mac Farland).

- Application :

  Appliquer 3µl des différentes suspensions sur la gélose à l'aide d'une anse de platine calibrée, ou à l'aide d'une micropipette.

- Incubation :

  Incuber 18h - 24h à 35°C.

- Interprétation :

  La CMI de chaque antibiotique correspond à la dernière boîte sans culture apparente.

b- E test :

Milieu : Gélose Mueller Hinton pré séchée

Inoculum : Faire une suspension bactérienne à 0.5 Mac Farland dans de l'eau physiologique

Ensemencement : Plonger un écouvillon stérile dans la suspension, le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois. Ensemencer la boîte en frottant l'écouvillon sur la surface de la gélose, en tournant la boite 3 fois de 60°. Déposer la bandelette Etest imprégnée de l'antibiotique à étudier.

Contrôle de qualité : Il est réalisé dans les mêmes conditions que les souches à tester. La souche témoin utilisée est l'ATCC 100721.

Incubation : 24 heures à 35°C.

Lecture : Lire la valeur de la CMI correspondant à l'intersection des 2 ellipses. (photo 12)

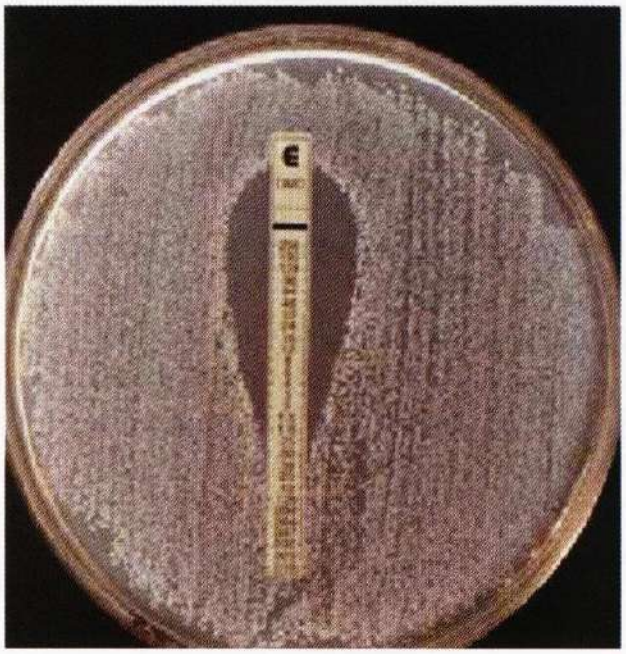


Photo 12 : E test

5- Mise en évidence de la toxine diphtérique :

1- Définition et mode d'action :

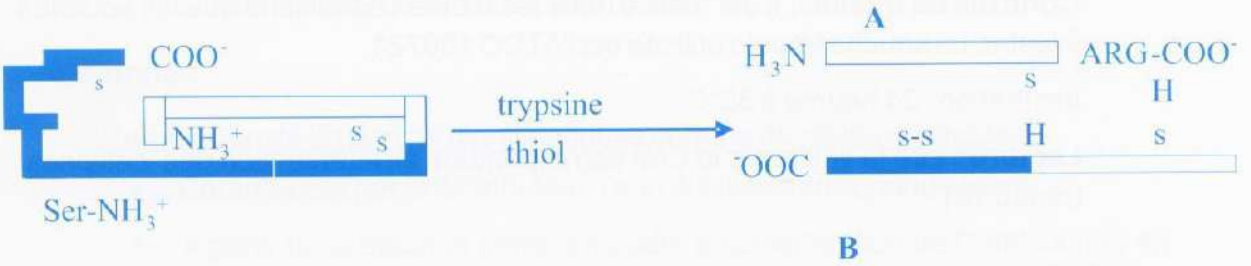
La toxine diphtérique DT représente le facteur de virulence responsable des manifestations cliniques, ainsi un milligramme de toxine purifiée représente 14000DMM (dose minimale mortelle).

Elle est produite par les souches toxinogènes porteuses du gène tox+ en présence d'une faible concentration de fer < 100µg /l (sinon la croissance est inhibée).

C'est une exotoxine protéique de PM = 58350 Da, constituée de 535 acides aminés, organisés en 2 fragments A et B reliés par un pont disulfure.

Fragment A : Fait 21167 Da, représente l'extrémité NH_2 terminale responsable de l'action toxique, se caractérise par sa stabilité vis à vis des variations de pH et de T°, mais aussi par sa résistance à l'action des enzymes protéolytiques.

Fragment B : De pM=37199 Da représente l'extrémité COOH terminale permet la fixation de la toxine sur le récepteur cellulaire se caractérise par son instabilité aux variations de pH, de T° et sa sensibilité à l'action des enzymes protéolytiques.



Action de la toxine

La toxine vient se fixer sur le récepteur cellulaire le précurseur de *l'heparin binding epidermal growth factor-* grâce à son fragment B, le complexe toxine-récepteur sera internalisé sous forme de vésicules recouvertes de clathrine qui passeront dans le compartiment endosomal. La diminution du pH des vésicules permet la séparation des 2 sous unités et le passage de la sous unité A à travers la membrane de la vésicule grâce à la sous-unité B.

Au niveau du cytosol, la sous unité A exerce son activité catalytique en présence du NAD^+ en inactivant le facteur d'élongation EF_2 (qui est le composant essentiel dans la synthèse protéique qui permet la translocation du polypeptidyl-tRNA du site accepteur A au site donneur P), d'où mort de la cellule.

$$\underset{\text{actif}}{NAD^+ + EF_2} \longrightarrow \underset{\text{inactif}}{ADP\text{-}ribosyl\text{-}EF_2} + Nicotinamide + H^+$$

2- Mise en évidence :

Peut se faire :

- **in vivo :** - détermination du pouvoir létal
  - neutralisation du pouvoir dermonécrotique chez le cobaye
  - sur culture cellulaire
- **in vitro :** - précipitation en milieu gélosé (test d'Elek)
  - mise en évidence du gène *tox* par PCR
  - immunochromatographie sur bande

*** Détermination du pouvoir létal**

Cette épreuve utilise 2 cobayes pesant chacun 300-400gr, l'un d'eux servira de témoin et recevra par voie intra péritonéale 0,5ml de l'antitoxine diphtérique titrant 200U/ml, 1h après on injecte en sous-cutanée de la face interne de la cuisse droite de chacun des cobayes 0,2ml d'une suspension bactérienne dense en eau peptonée

Résultat :

- Si le cobaye non protégé meurt en 2 à 4j (avec nécrose locale et œdème) alors que celui qui est protégé survit : il s'agit d'une souche de *C.diphteriae* toxinogène
- Si pas d'effet sur les 2 cobayes : il peut s'agir d'une souche de *C.diphteriae* non toxinogène
- Si à l'inverse un effet pathogène apparaît chez les 2 cobayes : il ne s'agit pas de *C.diphteriae* mais d'un autre germe pathogène pour le cobaye.

*** Recherche du pouvoir dermonécrotique par inoculation intradermique**

Utilise également 2 cobayes, dont l'animal témoin reçoit la veille de l'épreuve 1000unités d'antitoxines diphtériques. Le lendemain sur une peau rasée on injecte par voie intradermique 0,2ml d'une suspension dense de *C.diphteriae*, le cobaye non protégé reçoit alors une dose d'antitoxine (8U immédiatement ou 125U 6h après) pour éviter l'effet létal.

La lecture se fait en 48-72h par la mise en évidence de la réaction locale inflammatoire puis nécrotique.

Une autre méthode plus simplifiée, utilise un seul cobaye qui recevra successivement 2 injections intradermiques d'une suspension de *C.diphteriae* l'une avant et l'autre après administration d'antitoxine par voie intra péritonéale. L'absence de réaction du coté injecté après l'antitoxine, contrastant avec la réaction nécrotique du côté injecté avant l'antitoxine, confirme qu'il s'agit d'une souche toxinogène de *C.diphteriae*

* **Recherche sur culture cellulaire**

Utilise des cellules Vero qui ont la particularité de posséder plusieurs récepteurs pour la toxine diphtérique, celle-ci provoque un effet cytopathogène, en présence d'une souche fortement toxinogène NCTC10648 qui produit 5.120 CD/ml de toxine diphtérique et une souche faiblement toxinogène NCTC3984 produisant 1.280 Vero CD/ml de toxine diphtérique.

Il est possible d'utiliser des cellules de type Hela. La limite de détection est de 60pg/ml de l'activité biologique de la toxine diphtérique.

Il s'agit d'une technique spécifique, précise et quantitative mais présente des limites à savoir : technique longue réservée au laboratoire spécialisé

* **Test d'ELEK**

Le principe : il s'agit d'un test d'immunoprécipitation, qui consiste à cultiver une souche de *C.diphteriae* sur un milieu transparent en présence d'antitoxine, la production de toxine va se traduire par la formation d'une zone de précipitation due à la réaction antigène-anticorps.

Il en existe 2 types :

- Test d'Elek conventionnel
- Test d'Elek modifié

a- **Test d'Elek conventionnel** : 20 ml de milieu d'Elek fondu et ramené à 45°C sont additionnés de 4ml de sérum de veau fœtal, verser dans une boîte de Pétri de 9mm de diamètre.

Avant solidification, une bande de papier Whatman de 6 cm sur 1cm imprégnée d'antitoxine à raison de 1000UI/ml et égouttée est introduite, laisser alors durcir.

La boîte est inoculée par stries perpendiculaires à la bande avec les souches à tester [en prenant soin de prélever 6 à 10 colonies différentes, car risque de prélever une colonie tox-] en présence des souches témoins qui sont au nombre de deux :

- **A99 *C.diphteriae* subsp *intermedius*** ou **A102 Pw8 *C.diphteriae* subsp *mitis* toxinogènes**
- **ATCC100127 *C.diphteriae* subsp *mitis* non toxinogène** ou une souche de **S.aureus**

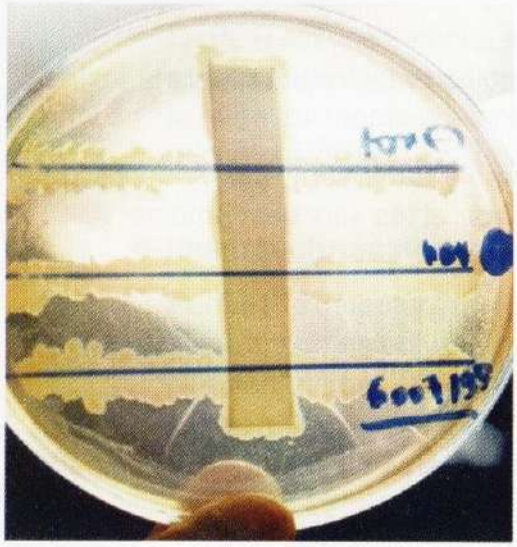
D'autres souches de références peuvent être utilisées :

NCTC10648 : ***C.diphteriae* subsp.*gravis* fortement toxinogène**

NCTC3984 : ***C.diphteriae* subsp *gravis* faiblement toxinogène**

NCTC 10356: ***C.diphteriae* subsp *belfanti* non toxinogène**

Incuber à 35°C, observer après 24 et 48h l'apparition des lignes de précipitation caractéristiques d'une réaction Ag-AC.



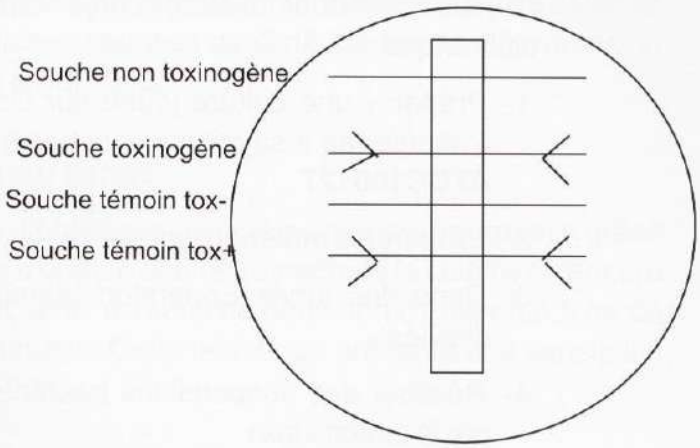
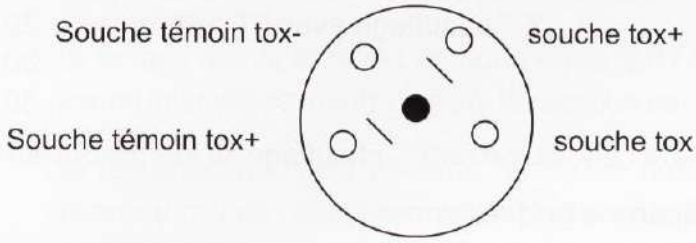


Photo 13 : test d'Elek

b- <u>Test d'Elek modifié</u> : la modification se situe au niveau :

- Du volume du milieu : 0,5ml de sérum de veau fœtal pour 2,5ml de milieu de base
  - De la boite de pétri de 4-5cm de diamètre
  - De l'antitoxine sous forme de disque à raison de 10UI/disque
  - De l'ensemencement des souches en spot à 9mm du disque



Les 2 tests possèdent la même sensibilité.

** **<u>Interprétation</u>** :

L'apparition des arcs de précipitation est le signe de positivité, ils seront pris en compte lorsqu'ils se trouvent à 10 mm de la jonction bande strie.

La lecture se fait après 24h et 48h.

c- Mise en évidence du gène tox par PCR

La PCR permet de détecter conjointement les deux fragments de la toxine diphtérique.

1- Préparer une culture jeune sur Columbia sans sang des souches de *C.diphteriae* à savoir les souches à tester et les souches témoins **A99, ATCC100127**

2- Préparer le matériel nécessaire (voir annexe)

3- Dans des tubes Eppendorf numérotés (1,5ml) déposer 100µl d eau distillée

4- Réaliser des suspensions bactériennes denses en terminant toujours par la souche tox+

5- Fermer correctement les tubes Eppendorf (risque d'ouverture), les déposer sur un portoir en mousse

6- Mettre au bain-marie bouillant pendant 10 min

7- Centrifuger 1min à 3000t/ min

8- Récupérer le surnageant ; possibilité de le congeler à 20° C

9- Dans un tube Eppendorf de 1,5ml mélanger 1µl d'olignucléotide1 + 1µl d'oligonucléotide2 + 0,5µl Taq polymerase + qsp 100µl tampon spécial PCR

10- Répartir 90µl du mélange préparé dans un tube Eppendorf de 0,5ml

11- Rajouter 10µl de l'extrait d'ADN

12- Allumer le thermocycleur

1ier chauffage 2 min à 94°C

2eme chauffage avec 3T différentes 20 sec à 94°C
30 sec à 62°C
30 sec à 72°C

répéter cette étape de 2ème chauffage 30 fois (ce qui fait environ 2h30)

13- Préparer le gel (voir annexe)

14- Dans un tube Eppendorf 0,5 ml : 10µl de l'ADN amplifie + 1µl de bleu de bromophénol

15- Déposer 10µl du mélange par puits. Ne pas oublier d'incorporer l'échelle 1Kb

16- Faire migrer dans le sens vers + a 100V et 68 mA pendant ¼ h a 1/2h

17- Faire sortir la plaque en gel

18- Lecture sous les UV [possibilité de reporter cette étape de 24h en gardant le gel à +4°C dans une boite en polystyrène]

La PCR est une technique simple rapide (moins de 4h) d'interprétation facile, pouvant être réalisée directement sur le prélèvement, permettant de détecter le gène tox même chez certaines souches de *C.diphteriae* dont l'expression biologique de la toxine ne se produit pas

d- Immunochromatographie sur bande

Permet de détecter la toxine diphtérique (spécifiquement le fragment A grâce à des anticorps poly clonaux d'origine équine) à partir de la culture ou encore directement du prélèvement, avec un seuil de détection d'environ 0.5 ng de toxine /ml en moins de 10 minutes. Cette technique présente une sensibilité de 98% et une spécificité de 99%.

C'est un test qualitatif.

6- Diagnostic indirect :

La recherche des anticorps antidiphtériques peut être réalisée par différentes techniques :

- test de Shick
- test de neutralisation chez l'animal
- test de neutralisation en culture cellulaire
- hémagglutination passive
- ELISA

- **Test de Shick** : met en évidence la sensibilité du sujet à la toxine diphtérique, se fait par injection ID de 0,1ml de toxine diphtérique (soit 1/50ème de la DMM pour le cobaye) dans l'avant-bras.

  Si le taux d'anticorps est compris entre 0,01 et 0,03UI/ml, la toxine injectée est neutralisée et la réaction est négative.

  Si les anticorps sont absents, la toxine non neutralisée va provoquer une réaction papuloérythémateuse en 24-48h, parfois tardive d'où la nécessité de faire une lecture tardive au 6ème- 7ème jour.

** Un contrôle est effectué sur le second bras en injectant de l'anatoxine, si on obtient une réaction positive sur les deux points d'injection, cela indique une réaction allergique à la toxine.

Avantages : Test peu coûteux
Bonne corrélation avec les taux sériques d'anticorps

Inconvénients : Difficulté technique (nécessitant 2 injections, 2 consultations) et dépend de la sensibilité cutanée individuelle (nouveau-né et jeune enfant).

- **Test de neutralisation chez l'animal** : réalisé sur la peau rasée d'un lapin ou d'un cobaye, en injectant différentes dilutions de sérum mélangées à une quantité connue de toxine. C'est un test long et cher.

- **Test de neutralisation en culture cellulaire** : sur microplaque, différentes dilutions de sérum sont mises en contact avec la toxine, après un temps d'incubation des cellules de type Vero ou Héla sont ajoutées.

  S'il y a présence d'anticorps, il se produit une neutralisation de la toxine et la multiplication cellulaire se poursuit.

  S'il y a absence d'anticorps, la multiplication cellulaire est modifiée

  Avantages : Test très sensible, limite de détection 0,005UI/ml

  Reproductible

  Nécessite une faible quantité de sérum

  Inconvénients : Ce test nécessite un personnel expérimenté en culture cellulaire et un équipement de laboratoire adapté.

- **Hémagglutination passive** : Le sérum décomplémenté et prétraité par le 2mercaptoethanol est mis en contact des globules rouges de mouton, dinde, cheval ou humains sensibilisés à l'anatoxine diphtérique. En cas de présence d'antitoxine diphtérique, il se produit une hémagglutination.

  Avantages : Ne coûte pas cher, rapide, reproductible, sensible, bonne corrélation avec les tests de neutralisation.

  Inconvénients : Tendance à sous-estimer les faibles taux d'anticorps antidiphtériques.

- **ELISA : (technique réalisée à l'IPA)**

  Le test ELISA a été mis au point pour la détection qualitative et quantitative des anticorps anti-toxine diphtériques de type IgG dans le sérum humain. Les anticorps recherchés contenus dans le sérum humain forment un complexe immun avec l'antigène fixé sur les cupules de la microplaque. Le conjugué enzymatique se lie ensuite à ce complexe. L'excès de conjugué non lié est éliminé par lavage. Le substrat de la peroxydase, la tétraméthylbenzidine (TMB), est ajouté dans chaque puits. En présence de l'enzyme, le substrat produit une coloration bleu foncée. Cette coloration vire au jaune quand la solution d'arrêt est ajoutée.

  ** Pour toute manipulation de produits biologiques, il est impératif de se munir d'une paire de gants et de porter un masque.

1- Mode opératoire

La technique ELISA utilisée est une méthode dont les réactifs sont prêts à l'emploi et commercialisée par différents laboratoires exemple **VIROTECH.**

1- Faire une dilution des sérums au 1/101 : (10 µl + 1ml) et repartir selon un plan de plaque bien défini la répartition des échantillons, des standards et des contrôles 100 µl de dilution pour le blanc réactif, 100µl de sérum standard, 100µl de sérums positifs fort et faible, ainsi que les sérums de patients dilués. Une série en double est recommandée.

2- Couvrir la plaque et incuber 30mn à 37°C.

3- Après incubation laver la microplaque 4 fois avec 350 à 400µl de solution de lavage diluée pour chaque puits. Retourner les plaques sur un papier absorbant afin d'éliminer la solution résiduelle.

4- Distribuer 100 µl de conjugué dans chaque puits.

5- Couvrir la plaque et incuber 30mn à 37°C

6- Après incubation laver la microplaque 4 fois avec 350 à 400 µl de solution de lavage diluée pour chaque puits. Retourner les plaques sur un papier absorbant afin d'éliminer la solution résiduelle.

7- Distribuer 100µl de solution de substrat TMB dans chaque puits (les puits positifs virent au bleu)

8- Couvrir la plaque et incuber 30mn à 37 °C à l'obscurité.

9- Stopper la réaction avec 50µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Agiter la plaque minutieusement afin de bien mélanger le liquide et d'homogénéiser la coloration jaune.

10- Essuyer le fond de la microplaque soigneusement et mesurer les densités optiques (DO) à 450/620nm. Faire le zéro sur le puits du blanc réactif.

Attention : La lecture doit se faire dans la demi heure qui suit l'arrêt de la réaction.

2- Evaluation et interprétation du test

Une courbe standard est tracée sur du papier semi-logarithmique en utilisant des sérums standard fournis par le laboratoire qui commercialise le Kit ELISA.

Cette courbe permet de déterminer le taux d'anticorps antitoxines diphtériques dans le sérum.

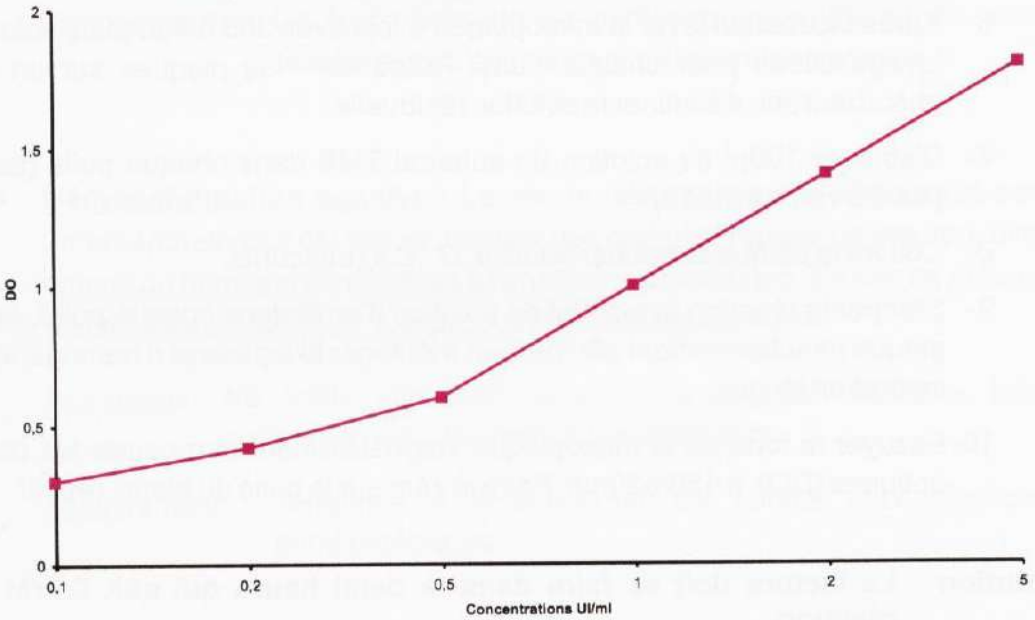
Les valeurs moyennes des densités optiques sont reportées sur l'ordonnée par rapport aux concentrations (UI/ml des standards prêts à l'emploi) des sérums standard en abscisse. Avec ces valeurs la courbe standard sera tracée et reliera tous les points des DO obtenus des sérums de malades.

Afin de faciliter l'interprétation des résultats, les valeurs des concentrations des sérums standard ont été multipliées par 100 vu que les sérums de patients ont été dilués au 1/100, donc le sérum standard 0.001 UI/ml devient 0.1 UI/ml et ainsi de suite.

La concentration en anticorps sera alors déterminée directement à partir de la courbe étalon.

NB: Les échantillons ayant une valeur supérieure à 5 UI/ml doivent être utilisés dans une dilution plus forte (dilution 1/200 ou 1/400) pour le test. Dans ce cas, les valeurs indiquées sur la courbe standard devront être multipliées par 2 ou 4.

Exemple de courbe standard pour la détection des IgG de la diphtérie



3- Interprétation des résultats

Selon les références scientifiques, une protection immunitaire suffisante peut être assurée **au-dessus de 0.1 UI/ml** mais ce chiffre n'est qu'une recommandation.

Le coffret ELISA IgG Diphtérie ne peut pas différencier les valeurs intermédiaires en dessous de 0.1UI/ml. Toutefois, il est recommandé d'indiquer que la concentration est < 0.1 UI/ml. Dans ce contexte un tableau sur les recommandations de vaccination (selon PIETSH M) est proposé.

Taux des antitoxines diphtérique en UI/ml	Vaccination recommandée
<0,1	Vaccination basique immédiate
0,1- 1,0	Rappel de vaccination immédiat
1- 1,4	Rappel de vaccination après 5 ans
1,5-2	Rappel de vaccination après 7 ans
>2	Rappel de vaccination après 10 ans

La détection du niveau des anticorps IgG peut être une aide décisive pour déterminer la nécessité d'une vaccination ou vérifier son succès.

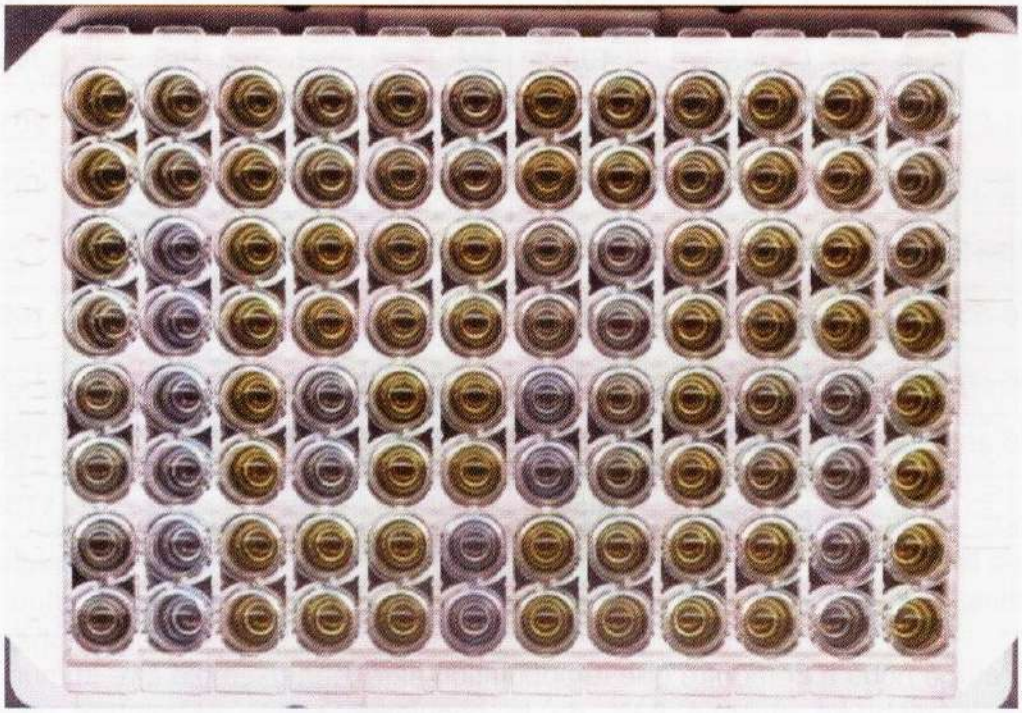


Photo n°14 : Modèle d'une plaque ELISA préparée au laboratoire

**Résultats d'une étude séroépidemiologique des antitoxines antidiphtériques

Elle a été réalisée sur 1755 sérums au sein du laboratoire de bactériologie médicale IPA (Pr Rahal) en 2002.

Pour cette étude nous avons pris un échantillon de chaque tranche d'âge.

Tranche d'âge	Titres d'antitoxines en UI/ml					Total
	<0,1	0,1-1	1-1,4	1,5-2	>2	
1-5 ans	15	**117**	27	10	34	**203**
6-10 ans	29	**106**	14	13	38	**200**
11-15 ans	37	**116**	10	7	46	**216**
16-20 ans	65	**190**	9	6	33	**303**
21-25 ans	54	**113**	8	5	21	**201**
26-35 ans	29	**102**	7	5	20	**163**
36-45 ans	16	**84**	7	4	18	**129**
46-55 ans	16	**68**	10	3	12	**109**
56-65 ans	19	**81**	8	2	13	**123**
66 ans et plus	19	**73**	5	4	7	**108**
Total	**299**	**1050**	**105**	**59**	**242**	**1755**

Cette étude nous a démontré que la population algérienne semble être immunisée contre la diphtérie puisque 83% de la population testée présentent un titre d'antitoxines diphtériques supérieure à 0,1UI/ml.

Résultats des analyses effectuées dans le cadre d'une épidémie de diphtérie en 2004 avec VIROTECH

Origine	Titres en UI/ml			Total
	< 0.1	0.1 - 1	> 2	
Tamanrasset	2	6	4	12 sérums
Djelfa	1	6	8	15 sérums
Externe	0	1	1	2 sérums
Total	**3**	**13**	**13**	**29 sérums**

Résultats d'une épidémie survenue en 2005-2006 à Adrar et Chelghoum Laid, technique ELISA réalisée avec des réactifs commercialisés par EUROIMMUN (26).

Origine	Titres en UI/ml				Total
	0,01-0,1	0.1 - 1	1-2	> 2	
Adrar	11	16	22	4	53 sérums
Chelghoum Laid (Mila)	3	3	10	4	20 sérums

Nous avons été obligés de changer de réactifs pour les épidémies d'Adrar et de Chelghoum laid car nous n'avons pas pu nous réapprovisionner en réactifs auprès de VIROTECH.

Les réactifs commercialisés par EUROIMMUN sont meilleurs car ils sont plus sensibles et donnent des valeurs en dessous de 0,1 UI/ml, ce que nous ne pouvions pas obtenir avec les réactifs Virotech (étude séroépidemiologique des antitoxines diphtériques).

7- Les marqueurs épidémiologiques :

La biotypie :

Le biotype le plus fréquemment isolé au cours des épidémies qui ont touché l'Algérie est ***Corynebacterium diphtheriae mitis*** et de temps à autre on retrouve le biotype ***gravis*** ; selon les résultats du tableau n°3 :

Tableau n°3 : Identification des souches isolées durant l'épidémie 1993-1995

Année	1993	1994	1995	Total
Identification				
Galerie classique				
C.diphtheriae	5	24		**29**
Api				
C.diphtheriae mitis	7	53	11	**71**
Coryne				
C.diphtheriae intermedius	0	0	0	**0**
C.diphtheriae gravis	0	8	0	**8**
Total	**12**	**85**	**11**	**108**

Selon le listing des souches reçues à l'IPA entre 1996 et 2005 ; il y a eu :

- 48 souches du biotype mitis
- Une seule souche du biotype gravis
- L'isolement de 4 souches de biotype belfanti : souches isolées chez des patients non hospitalisés.

Lors de l'épidémie de diphtérie a sévi à Adrar fin 2005 début 2006 : il y a eu isolement de 3 souches du biotype mitis et d'une seule souche du biotype gravis.

Dans le monde, au cours de l'épidémie qui a touché les nouveaux états indépendants de l'ex URSS au début des années 1990, les souches prédominantes étaient de la variété gravis.

Mais Depuis 2000, la plupart des cas de diphtérie déclarés par ces états sont causés par la variété mitis.

La toxinotypie :

En Algérie, l'étude de la toxinotypie réalisée a concerné 99 souches isolées entre 1993et 2001 à l'IPA.

Tableau n°4 : Etude du pouvoir toxinogène des souches isolées entre 1993-2001

	Elek	PCR	Elek+PCR
C .diphtheriae Tox +	2	5	44

Les souches qui ont donné un résultat positif en Elek uniquement suggèrent la présence d'arcs non spécifiques.

Les souches qui ont donné un résultat positif en PCR uniquement : ceci pourrait être dû a l'existence d'un mélange de populations Tox+ et Tox- au sein d'un même isolat comme décrit par Simmons et al ou bien la circulation de souches porteuses de gènes silencieux mais d'autres auteurs tel que Pallen et al : décrivent des réactions faussement positives en PCR (3%).

Compte tenu de l'importance du caractère toxinogène des souches de *Corynebacterium diphtériae* surtout pour la prise en charge thérapeutique, il est important d'adopter une technique rapide tel que la PCR mais il faut alors tester plusieurs colonies à partir d'un même isolat unique, en tenant compte du fait qu'il peut y avoir un mélange de populations tox+ et tox -.

Entre 2003 et 2005, 12 souches de *Corynebacterium diphtheriae* toutes toxinogènes ont été identifiées.

L'antibiotypie :

L'étude de la sensibilité des souches isolées durant l'épidémie 1993-1995 a été réalisée selon la méthode standard de diffusion des disques en milieu gélosé, suivant les critères définis par la société française de microbiologie ;

La souche 100721 *C.diphtheriae* résistante à la Fosfomycine a été utilisée comme souche de référence.

Tableau n°5 : profil de résistance des souches isolées au cours des années 1993-1994-1995

Marqueurs de résistance	1993	1994	1995	Total
Tb-C-Su	12	72	11	**95**
Tb-Su	0	6	0	**6**
Tb	0	1	0	**1**
Su	0	6	0	**6**

TB : Tétracycline, C : Chloramphénicol, Su : Sulfamides,

Les souches isolées durant cette période étaient sensibles à la pénicilline G, aux macrolides dont l'érythromycine et également aux aminosides, quinolones, glycopeptides, rifamycines, acide fusidique, trimethoprime et cotrimoxazole.

La plupart étaient résistantes aux tétracyclines, chloramphénicol, sulfamides et fosfomycine.

4 profils antibiotypes ont été observés selon les données du tableau.

Dans une autre étude effectuée à l'IPA, 110 souches de *C.diphtériae* ont été récoltées entre 1992 et 2005, les antibiogrammes réalisés selon les normes CA SFM(l'antibiogramme étant non standardisé) permettent d'observer les résultats suivants.

Profils de résistance	Tb- C -Su	Tb	Tb- C	C- Su	Su
C.diphtériae	74	8	19	6	1

On remarque que ce sont toujours les mêmes antibiotiques qui sont touchés, avec d'autres profils à savoir :

- Tb C
- C Su
- Su

La lysotypie :

Cette technique mise au point pendant les années 1970 en Roumanie est basée sur la sensibilité de la bactérie testée à la lyse par une batterie de phages ;

Deux schémas de classification ont pu ainsi être proposés : Un schéma initial, utilisant 22 phages et un schéma complémentaire avec 33 phages. Malgré le nombre important de phages utilisés, il existe des souches non typables et lysorésistantes, la plupart de ces phages dérivent du phage 951L.

Nous disposons de données partielles concernant les souches Algériennes isolées durant la période allant de 1993 à 1995 car seulement 39 souches choisies ont bénéficié de lysotypage en Roumanie.

Tableau n°6 : Lysotypie en Roumanie des souches de l'épidémie 1993-1995

IPA	Roumanie	Lysotype	Nombre de souches
C.diphthériae mitis	*Intermedius*	VI	11
C.diphthériae mitis	*mitis-intermedius*	VI	22
C.diphthériae mitis	*mitis-intermidius*	Lysorésistante	1
		Non lysotypable	1
C.diphthériae gravis	*Gravis*	Lysorésistante	4

Ribotypage :

Méthode universelle de typage moléculaire de la bactérie basée sur la détermination du profil de restriction de l'ARN ribosomal.

Les endonucléases utilisées en standard étaient *BstEII (premier choix)* et *PvuII (second choix)*, les ribotypes obtenus avec ces enzymes ont souvent des bandes communes, ce qui facilite la comparaison.

Il existe actuellement une base de données de tous les ribotypes de *C.diphthériae* adoptant une nomenclature standard.

A ce jour, 86 ribotypes distincts obtenus par l'endonucléases *BstEII* ont été sélectionnés dans la base de données : A chaque profil de ribotype correspond une souche de référence possédant un seul nom géographique, produisant un profil de ribotypes stable et reproductible

Ces souches ont été également soumises au ribotypage automatisé à l'aide du système de caractérisation microbien RiboPrinter (USA) qui utilise les deux endonucléases.

Il est alors possible d'identifier et de vérifier de nouveaux clones de *C.diphthériae* génétiquement définis et des clones existants ayant un potentiel épidémique.

Les souches Algériennes isolées durant la période allant de 1993 à 1995 ont bénéficié d'un ribotypage ; l'usage de l'endonucléase *BstEII* a mis en évidence 5 ribotypes (B1à B5) avec une prédominance du ribotype B1 ; le ribotypage des souches algériennes a été réalisé au niveau de l'institut de bactériologie de Strasbourg, 5 ribotypes différents ont été identifiés pour les souches de biotype *gravis* et 2 pour le biotype *mitis*.

En Biélorussie, au cours des dernières années, la majorité des souches toxinogénes isolées étaient de biotype *gravis*. Les ribotypes étaient principalement Saukt-Petersburg, Rossija et lyon.

VI- PREVENTION

1- Rappel sur l'anatoxine diphtérique :

L'anatoxine diphtérique a été mise au point par Ramon en 1923 en traitant pendant 4 semaines la toxine diphtérique par du formol à 4‰ à 40°C.

Actuellement, la détoxification se fait par un traitement avec 0,1-0,2% de formol à pH = 6-9 à 37°C pendant plusieurs semaines.

L'anatoxine produite est associée à des adjuvants pour maintenir son antigénicité. Exp:hydroxyde ou phosphate d'alumine, phosphate de Ca, thiomersal.

Le vaccin titre 30 unités antigéniques internationales/ml

2- Intérêt de la vaccination et son déroulement :

Depuis 1977, la vaccination contre la maladie est devenue obligatoire et ceci dans le but de l'éradiquer. Pour atteindre cette objectif il fallait qu'une tranche très importante de la population soit immunisée (75%).

L'anatoxine diphtérique existe toujours sous forme associée, souvent avec le Tétanos d'où l'abréviation DT.

Le vaccin existe sous 2 formes :

- *Forme pédiatrique DT*
- *Forme adulte Td* qui contient 1/10 d'anatoxine diphtérique contenue dans la forme enfant, elle est destinée aux enfants âgés de 7 ans et plus, adolescents, adultes (une dose de 0,5ml contient au moins 2UI d'anatoxine diphtérique purifiée)

Le vaccin utilisé peut être de type :

- Double (DT) contre la Diphtérie et Tétanos : *Diftavax®, DTVax®*
- Triple (DTP) contre la Diphtérie, Tétanos et Poliomyélite : *DTPolio®, Vaccin DTP Pasteur®*
  ou encore (DTCoq) contre la Diphtérie, Tétanos et la Coqueluche: *DTCOQ®*
- Quadruple (DTCP) contre la Diphtérie, Tétanos, Coqueluche et Poliomyélite : *DTCP®, TETRACoq®, Infanrix® Polio Enfant*, Tetravac® acellulaire
- Quintuple (DTCP+ Hi) contre la Diphtérie, Tétanos, Coqueluche, Poliomyélite et *Haemophilus influenzae* : *Infanrix Polio HIB, Pent-Hibest®, Pentacoq®, Pentavaq®*

La pratique de la vaccination se fait par injection par voie sous-cutanée ou par voie intramusculaire selon le calendrier vaccinal algérien :

3 injections à 1 mois d'intervalle à partir du 2ème mois

1ier rappel : 16-18 mois

2ème rappel : 6 ans

3ème rappel : 11-13 ans

4ème rappel : 16-18 ans

Un rappel est effectué après 10 ans, au service militaire, mais aussi pour le personnel médical sans oublier les convalescents.

Ce vaccin est le plus anodin, mais de rares effets secondaires sont possibles : fièvre, réactions locales d'hypersensibilité, nodule au point d'injection.

ANNEXE

Coloration

Coloration d'El Vicchio :

Sur le frottis fixé à la chaleur :

- Faire agir le bleu de méthylène pendant 1 minute;
- Laver à l'eau
- Recouvrir la lame de lugol;
- Chauffer jusqu'à émission de vapeur;
- Laver à l'eau et sécher.

Le corps bactérien est coloré en jaune, les granulations sont colorées en bleu foncé.

Conservation

Se fait soit par :

1- Congélation à -80°C dans du bouillon additionné de 15 % de glycérol

2- Lyophilisation

3- Gélose profonde à base de Mueller Hinton (meilleure conservation)

Composition des milieux

Milieu CTA :

Cystéine	5g
Pancreatic digest	20g
Na Cl	5g
Rouge de phénol	0.017g
Agar	2.5g
H_2O distillée	1000 ml
pH	7.3

Milieu MEVAG sans sucre :

Casitone	3g
K_2PO_4	0.3g
K CL	5g
Rouge de phénol	0.05 g/5 ml
Agar	5g
H_2O distillée	1000 ml
pH	7.8

Milieu pour test d'ELEK

1- Formule utilisée à l'IPA (emprunté au Laboratoire de Strasbourg)

Solution I (400ml) : 16g protease peptone n° III
2,4g maltose
0,56ml acide lactique
400ml H2O distillée
mélanger, chauffer jusqu'à dissolution
ajuster à pH 7,8
autoclaver, filtrer

Solution II (400ml) : 12g agar
4g Na Cl
400ml H2O distillée
Mélanger les ingrédients de chaque solution, autoclaver
Mélanger I dans II avant durcissement de celle-ci, répartir à raison de 10ml /tube
Conserver à +4°C pendant 3-6 mois

2- Formule Difco KL Virulence Enrichissement (milieu commercialisé)

Base :	Bacto proteose peptone	20g
	Na Cl	2,5g
	Bacto agar	5g
Additif :	A.casaminoique	1g
	Glycérol	1ml
	Polysorbate 80	1ml

Mélanger 37,5g de la base dans 1l d'H2O

Autoclaver 15min à 121°C, refroidir à 55°C

Mettre aseptiquement dans une boite de Pétri : 10ml de milieu et 2ml d'additif

Mélanger par des mouvements de rotation

Milieu de Tinsdale

Proteose peptone n°3	20g
L.cysteine	0,25g
NaCl	5g
Thiosulfate de Na	0,43g
Agar	15g
H_2O	1l

Dissoudre la Cysteine dans 10ml HCl 0,1N, ajuster à pH 7,4
Mélanger les ingrédients, porter à ébullition
Autoclaver 15 min à 120°C
Ramener à 56°C, ajouter : 10 ml de sérum de cheval
3 ml de tellurite de K 1%

Couler en boîte

Milieu de Loeffler (sérum de bœuf coagulé)

Mélanger : 75ml de sérum de bœuf

25ml d'un bouillon nutritif glucosé à 1%

Répartir en tubes stériles à raison de 6 à 8 ml/tube.

Les tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 75°C dans une position inclinée afin d'obtenir une surface importante du milieu.

Retirer les tubes une fois le contenu solidifié.

Le sérodiagnostic de la Diphtérie

1- Réactifs

- KIT ELISA pour la détermination des antitoxines diphtériques commercialisé par les laboratoires **VIROTECH**
- Kit anti-Diphtherie-toxoid-ELISA (IgG) commercialisé par **EUROIMMUN.** Référence EI 2040-
- -Eau distillée PH7

2- Matériels

1- Micropipettes multicanaux de 200µl avec embouts
2- Tubes de Kahn
3- Portoirs
4- Etuve à 37°C
5- Lecteur ELISA avec imprimante
Laveur pour microplaque

Spécial PCR

Matériels nécessaires pour la recherche du gène tox

- Pipettes automatiques
- Cônes bleus. jaunes
- Tubes Eppendorf
- Themocycleur
- Mini cuve à électrophorèse
- Centrifugeuse

Réactifs utilisés en PCR

❖ **Solution tampon spécial PCR**

Solution Tris 100mM pH 8,2/KCl 500mM	100µl
$MgCl_2$ 100mM	40µl
dNTPs 100mM	1µl
BSA 10mg/ml	1µl
β mercaptoethanol	1µl
H_2O	qsp 1ml

- **Solution Tris**

TRIZMA base 1M	121,1g
H_2O	800ml

Ajuster le pH a 8,2 avec du HCl

Compléter avec du H_2O jusqu'à 1000ml

Autoclaver 30min a 110°C

- **Solution $MgCl_2$ (0,1M)**

$MgCl_2$, 6 H_2O	20,3g
H_2O	qsp 1000ml

Autoclaver 30 min a 110°C

- **Solution KCl**

KCl 0,5M	37,275g
Solution Tris pH8,2	100ml
H_2O	qsp 1000ml

Autoclaver à 110°C pendant 30min

- **dNTPS**

Acétate d'ammonium 7,5M	oligonucléotides
Acétate d'ammonium	57,8g
H_2O	qsp 100ml

Filtrer sur membrane à 22µm

- **Solution de sérum albumine bovine BSA (10ug/ml)**

Mélanger 1g de BSA dans 100ml de PBS

Filtrer sur filtre 0,2µm

Stocker à – 20°C

- **Solution Tris acétique-EDTA [TAE 50X]**

Tris-base	240g
A.acétique glacial	57,1ml
EDTA	20g
H_2O	qsp 1000ml

Autoclaver, diluer au 1/50 pour l'emploi

- **Bleu de dépôt (10x)**

  Mélanger 100µl solution aqueuse bleu de bromophénol à 1%
  100µl EDTA 0,5M pH8
  300µl Glycerol 50%

- **Solution échelle 1Kb**

  Mélanger 170µl H_2O
  20µl bleu 10x
  10µl échelle 1Kb

- **Préparation du gel à 2%**

  1g d'agarose
  50ml TAE (1ml TAE x50 dans 49ml H2O distillée stérile)
  mélanger, chauffer au micro-onde pendant 1min
  laisser refroidir, et rajouter 3,5µl BET pour 50ml de gel
  mettre en place le peigne pour les puits, couler rapidement le gel dans la cuve

Caractères biochimiques différentiels des différentes espèces de *Corynebacterium*

	Cat	βH	NAR	Urée	Gelat^{ase}	mobilité	esculine	pyr^{ase}	Pyr.aryl^{ase}	glu	mal	sac	man	xyl
C.diphteriae	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
C.ulcerans	+	+	-	+	+ 25C	-	-	-	-	+	+	-	-	-
C.pseudotuberculosis	+	+	V	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
C.xerosis	+	-	+	-	-	-	-	+	V	+	+	+	-	-
C.striatum	+	-	+	-	-	-	-	+	V	+	-	+	-	-
C.kutscheri	+	V	+	+	-	-	+	v	+	+	+	+	-	-
C.cystidis	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	v
C.pseudodiphtericum	+	-	+	+	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-
C.jeikeium	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	v	-	-	-
C.genitalium	+	-	-	-	-	-	-	nd	Nd	+	fble	-	-	-
C.urealyticum	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

nd : non déterminé, v : variable, fble : faible

glu :glucose, mal : maltose, sac : saccharose, man :mannitol, xyl :xylose

cat : catalase, pyr^{ase} : pyramidase, pyr.aryl^{ase} : pyrrolidonyl arylamidase, NAR : nitrate réductase

ANNEXE II- CIRCULAIRE N° 1126/MSP/DP/SDPG/du 17 Novembre 1990 relevé des maladies a déclaration obligatoire

Wilaya de .....
Secteur Sanitaire de : .....
Chu de : .....
Hôpital spécialisé de : .....

Unité Sanitaire : .....
Service : .....
Autre : .....
Adresse : .....

Semaine
Du : .....
Au : .....

N°	Date	Nom et Prénom	Age	Sexe		Adresse	Maladies (en toute lettre	Observations
				M	F			

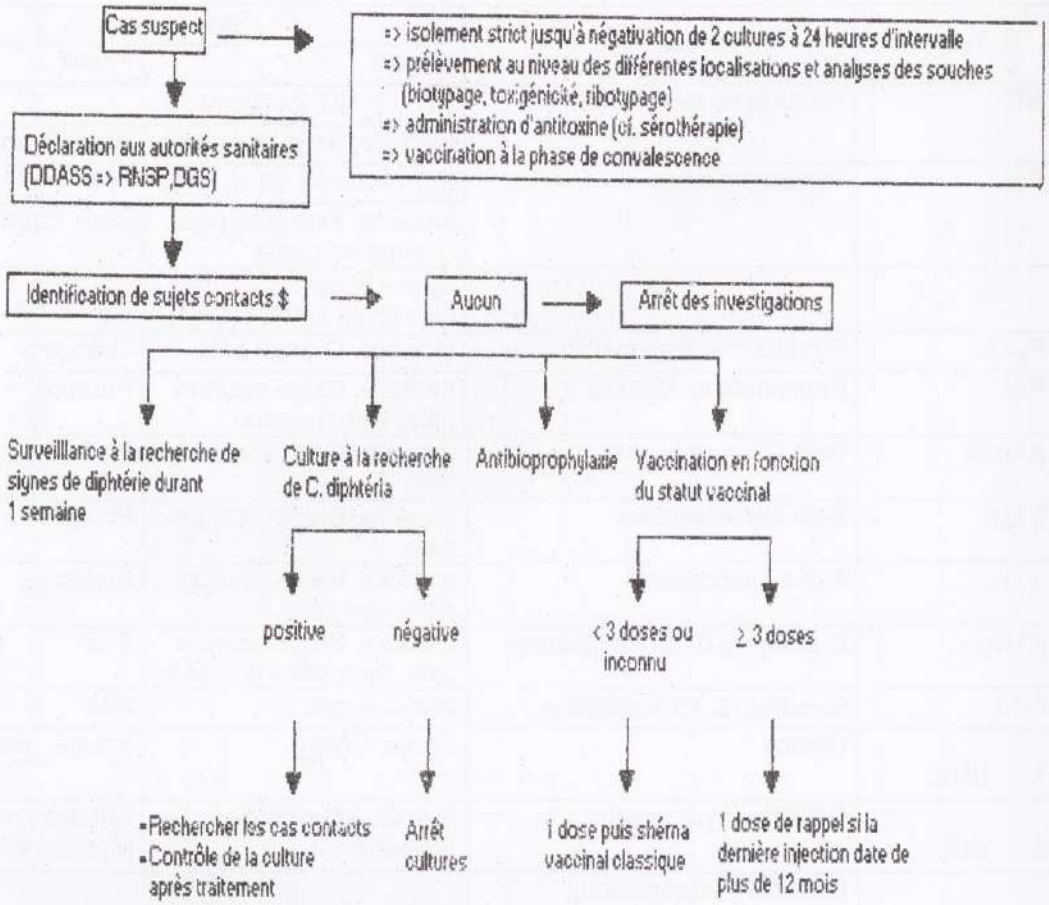
Nom et qualité du signataire

Fait à ..... le .....
Signature du Médecin

Tests biochimiques de la galerie API Coryne

Tests	Réactions	Résultats	
		Négatif	Positif
NIT	Réductions des nitrates	NIT 1 + NIT 2 (10mn)	
		Incolore, Brun très pâle	Brun, Orange
Pyz	Pyrazinamidase	Pyz (10mn)	
		Incolore, Brun très pâle, Orange très pâle	Brun, Orange
		Zym A + Zym B (Pyr A à β NAG) (10mn)	
Pyr A	Pyrrolidonyl Arylamidase	Incolore, Orange pâle	Orange
PAL	Phosphatase Alcaline	Incolore, Beige-pourpre pâle, Orange pâle	Pourpre
β GUR	Bêta Glucuronidase	Incolore, Gris pâle, Beige pâle	Bleu
β Gal	Bêta Galactosidase	Incolore, Beige- pourpre pâle	Pourpre
α Glu	Alpha Glucosidase	Incolore, Beige-pourpre pâle, vert pâle	Pourpre
β Nag	N-acetyl, β Glucosaminidase	Incolore, Beige pourpre pâle, brun pâle, gris pâle	Brun
ESC	Esculine (β- Glucosidase)	Incolore, gris	Noir
1 URE	Urease	Jaune, orange	Rouge, rose
2 GEL	Gélatine (hydrolyse)	Pas de diffusion de pigment	Diffusion de pigment noir
3 0 ***3.1 Glu*** ***3.2 Rib*** Xyl Man Mal Lac Sac Glyg	Contrôle (fermentation) Glucose Ribose Xylose ***3.3 Mannitol*** Maltose Lactose Saccharose Glycogène	Rouge Orange	Jaune Jaune – orangé
4 Cata	Catalase (test Esc ou Gel)	H2O 3% (1min)	
		Absence	Présence de bulles

Conduite à tenir devant un cas de diphtérie (tiré du BEH 23/98)



$ les sujets sont définis comme :

=> personnes vivant au domicile
=> amis ou visites fréquentes au domicile
=> relations intimes
=> sujets travaillant dans la même pièce
=> personnel de santé exposé aux sécrétions oropharyngées
=> transport (voyage de plusieurs heures) : passagers occupant les places voisines

Bibliographie

1. AVRIL J.L, DABERNAT H, DENIS F, H.MONTEIL « Corynebacterium » *Bactériologie Clinique 3ème édition 2000, p122-136*

2. BARON S., BIMET F., LEQUELLEC-NATHON M., PATEY O, REBIERE F, VACHON F. «Conduite à tenir lors de l'apparition d'un cas de Diphtérie» *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1998, 23, p1-9

3. BELHOCINE S., RAHAL K. « L'épidémiologie de diphtérie en Algérie (1993-1995) .Données bactériologiques. » *Médecine Maladies Infectieuses ;1996 , 27 :842-847.*

4. BELHOCINE S., RIEGLE P., BIMET F., KIREDJIAN M., RAHAL K., PATEY O. «Molecular Epidemiology of Diphtheria in Algeria, 1993-1996» *Fourth International Meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria. Lausanne, Switzerland, may 25-28,1997*

5. BEYTOUT J., LAMICHESSE H., REY M. « Vaccination » *EMC Maladies Infectieuses 2001 :8-002-Q-10,p :1- 14*

6. BOUVET E. « La Diphtérie en 1997» *La Revue du Praticien ; 1997 :11 ,400*

7. CARBONNELLE B., DENIS F. « Les bacilles Gram positif à l'exception des anaérobies » *Bactériologie médicale : techniques usuelles 2ème tirage*1988, *p 177-178*

8. DEBOSCKER Y. «Diphtérie » *EMC Maladies Infectieuses 1986 :8017 ,p :1-14*

9. H.ENGLER K., GLUSHKEVICH T., K. MAZUROVA I., GEORGE R.C., EFSTRATION A. « A modified Elek test for detection of toxigenic Corynebacteria in the diagnostic laboratory» *Journal of Clinical Microbiology 1997: 35,2:495-8*

10. A.EFSTRATIOU K.H.ENGLER C.S.DAWES D.SESARDIC « Comparaison of phenotypic and genotypic methods for detection of Diphteria toxin among isolates of pathogenic Corynebacteria» *Journal of Clinical Microbiology Nov 1998.36,11:3173-3177*

11. ENGLER K.H., EFSRATION A., NORN D., KOZLOV R.S., SELGA I. « Immunochromatographic strip test for rapid detection of Diphteria toxin :description and multicenter evaluation in areas of low and high prevalence of Diphteria » *Journal of Clinical Microbiology Jan2002.40,80-83*

12. FRENEY J., DUPPERRON MT., COURTIER C., HANSEN W., ALLARD F., BENFGRAS JM., MONGET D., FLEURETTE J. «Evaluation of api Coryne in comparaison with conventional methods of identifying corynebateria» *Journal of Clinical Microbiology 1991, 29:38-41*

13. FRENEY J., RENAUD F., HANSEN W., BOLLET C. « Corynebactéries » *Manuel de bactériologie clinique Vol 2, 2ème edition Elsevier, novembre 1994, p781-807*

14. KELLY C., EFSTRABIOU A., «compte rendu du Septième Congrès international du groupe de travail Européen sur la Diphtérie Vienne, juin 2002» *Euro surveillance 2003 , 8, n°10*

15. LE MINOR, VERON M., « Corynebactéries » *Bactériologie Médicale. 2ème édition,* 1989 *p 191-246, 953-963*

16. MARCHAL M. et coll « Corynebactéries » *Bactériologie médicale et vétérinaire 2ème édition, 1981 2ème tirage p 259*

17. PATEY O., DELLION S., HALIOUA B., « Diphtérie et infections à Corynebactérium diphtheriae. » *La lettre de l'infectiologue. 1996,17, p : 539-548*

18. PATEY O., BIMET F., .RIEGEL Ph., HALIOUA B., EMOND B., DELLION S., ANDRONESCU S., D.GRIMONT P.A. et KIREDJIAN M. ; «Apport des méthodes de typage dans l'étude des souches de *Corynebacterium diphtheriae*» *Médecine Maladies Infectieuses ; 1996 ; 26 :386-388.*

19. Système d'identification des bactéries coryneformes (BioMerieux)

20. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS .MSP, 4ème édition 2005, ANDS, Alger

21. HANSEN W., FRENEY J., « La Diphtérie, son histoire, et la découverte de l'agent étiologique et sa toxine » *Lyon Pharmaceutique 1996,47 :304-314*

22. WHO/EPI/GEN/93.12 «Les bases immunologiques de la vaccination : La Diphtérie» p13

23. TALI-MAAMAR H., LAZRI M., RAHAL K., « Toxinotypie des souches de *Corynebacterium diphtheriae* isolées en Algérie *Médecine et Maladies infectieuses ,33 ; 180-182 ; 2003.*

24. TOUATI D., RAMDANI N., TALI-MAAMAR H., RAHAL K., « Endocardite à Pneumocoque » *communication Journées de Pédiatrie*

25. Pietsh M. Impfseroloie zur erganzung von impfungen Der Allgemermarzt, 18, 1993

26. Lübeck- seekamp. Antidiphteria toxoid Elisa IgG Euroimmun, KIT 2004.

Circulaire Ministérielle

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE

N° 017 MSPRH/MIN 13 FEB 2007

DIRECTION DE LA PREVENTION
SOUS- DIRECTION SANTE MERE ET ENFANT

CIRCULAIRE MINISTERIELLE N° MPSRH/DP/SME DU

----------DESTINATAIRES----------

- MESSIEURS LES WALIS	POUR INFORMATION
- MADAME ET MESSIEURS LES DSP	POUR EXECUTION
- MESDAMMES ET MESSIEURS LES DG DES CHU	POUR EXECUTION
- MESSIEURS LES DG DES EHS	POUR EXECUTION
- MESSIEURS LES DIRECTEURS DES SECTEURS SANITAIRES	POUR EXECUTION

OBJET : Fiche technique relative à la conduite à tenir devant un cas de suspect de Diphtérie.

L'Algérie, après un répit, a connu une réapparition de la diphtérie sous forme de flambées épidémiques durant l'année 1993 (563 cas et 31 décès). Deux importantes épidémies ont ensuite été enregistrées en 1996 (107 cas) et en 1997 (30 cas) touchant la presque totalité des Wilaya.

Les cas notifiés en 2003 (Tiaret 07 cas), en 2004 (Tamanrasset 08 cas) et en 2005 (Mila 04 cas et Adrar 03 cas) ont touché des populations nomades.Ce phénomène est du à des causes multiples notamment les mouvements de populations à travers les frontières du sud du pays, l'insuffisance de la couverture vaccinale et la faible protection immunitaire au sein de ces populations. Si le dispositif mis en place a permis de maîtriser l'épidémie, il n'en demeure pas moins que l'Algérie n'est pas à l'abri de l'apparition de nouveaux foyers épidémiques.

Il apparaît donc clairement qu'une couverture vaccinale doit être maintenue constamment au niveau le plus élevé possible pour toutes les vaccinations obligatoires.

Cette présente circulaire actualisée rappelle les modalités pratiques de la conduite à tenir devant un cas suspect de Diphtérie décrites dans la Circulaire Ministérielle N°755 MSP/DP/SDPG du 31 Octobre 1994.

Dans le cadre du renforcement de la surveillance et de l'amélioration de la prise en charge des cas, j'accorde la plus haute importance à la large diffusion et à l'application de cette circulaire à l'ensemble du personnel de santé à tous les niveaux.

LE DIRECTEUR DE LA PREVENTION

13 FEB 200

وزير الصحة و السكان و إصلاح المستشفيات

عمار طو

I- CIRCONSTANCES DU DIAGNOSTIC (cf ANNEXE N°I RAPPEL CLINIQUE)

Il est indispensable de faire un diagnostic précoce de la maladie qui doit être évoquée :

- systématiquement devant une angine à fausses membranes,
- devant toute angine et toute laryngite chez un sujet mal ou pas vacciné contre la diphtérie, survenant dans un contexte épidémique ou sporadique,
- devant toute angine s'accompagnant de signes évocateurs : asthénie, pâleur, fièvre ne dépassant pas 38°5 et tachycardie,

La notion d'une vaccination antidiphtérique ne doit pas faire éliminer le diagnostic de la diphtérie.

II- MESURES A PRENDRE D'URGENCE DEVANT UN CAS SUSPECT DE DIPHTERIE

II- 1 IL FAUT IMMEDIATEMENT :

1. hospitaliser et isoler le cas, **repos strict au lit et surveillance clinique**
2. pratiquer un prélèvement de gorge (annexes N° I et II diagnostic bactériologique) avant tout traitement pour identifier le germe,
3. prescrire la **sérothérapie** (Sérum antidiphtérique SAD) pour neutraliser la toxine circulante, et l'**antibiothérapie** pour détruire le germe (cf chapitre mesures thérapeutiques)
4. déclarer obligatoirement la maladie selon les modalités de notification des Maladies à Déclaration Obligatoires (Arrêté n° 179/MS/CAB du 17 Novembre 1990 fixant la liste des maladies à déclaration obligatoire et les modalités de notification) .
5. **vaccination** à l'issue de la guérison.

II-2- MESURES THERAPEUTIQUES :

Le traitement curatif a pour but de neutraliser la toxine circulante (par la sérothérapie), de détruire le germe (par l'antibiothérapie) et de prévenir la survenue de complications.

Il doit être institué en urgence, au moindre doute et avant le résultat de l'examen bactériologique.

II-2-1 - Sérothérapie

Le sérum antidiphtérique (SAD) est administré selon la méthode de BESREDKA (pour éviter le choc anaphylactique) qui consiste à injecter en sous cutané 0,1 ml de SAD, puis 0,25 ml 15 minutes après, et si aucune réaction ne se produit pendant 15 minutes on injecte alors la moitié de la dose restante en sous cutanée (S/c) et l'autre moitié en Intra Musculaire (IM).

La posologie est fonction du poids **du malade** et de la gravité de la maladie. Elle est :

- Chez l'enfant de **2000 à 5000 UI/kg** soit **20 000 à 40 000 UI en dose totale**
- Chez l'adulte de **40 000 à 60 000 UI sans dépasser 120 000 UI**

II-2-2 - L'antibiothérapie

Elle fait appel à :

En première intention à la **Pénicilline G**:

- Chez l'enfant à raison de 100 000 UI/kg/j en 2 injections IM pendant 10 jours.
- Chez l'adulte à raison de 2 millions d'unités par jour en 2 injections IM pendant 10 jours.

En cas d'allergie à la Pénicilline, à l'Erythromycine:

- Chez l'enfant à raison de 50 mg/kg/j **en 04 prises** pendant 10 jours
- Chez l'adulte à raison de 2g/j **en 02 prises** pendant 10 jours

II-2-3 - Le repos strict au lit

Il est **indispensable**, du fait du risque potentiel non négligeable de myocardite et de mort subite. Sa **durée est de 21 jours dans l'angine diphtérique commune. Il sera prolongé dans les formes compliquées.**

II-2-4 - Vaccination (anatoxine diphtérique)

A l'issue de la guérison, le malade devra être vacciné contre la diphtérie quel que soit son état vaccinal antérieur **car la maladie n'est pas immunisante.** Il recevra à cet effet, une primo vaccination de 3 doses de DT enfant ou dT adulte à un mois d'intervalle et un rappel un an après.

II-2-5 - Traitement des complications

En cas de croup (laryngite diphtérique) il faudra associer des corticoïdes en IV ou en IM (Hémisuccinate d'hydrocortisone ou Dexamétasone). En cas d'aggravation ou de non amélioration après quelques heures (06 heures) le transfert en réanimation pour intubation ou trachéotomie s'impose.

En cas de myocardite ou de paralysies (vélopalatine ou respiratoire) le traitement devra être conduit en milieu spécialisé. Il faut procéder à l'arrêt de toute alimentation orale en cas de paralysie vélopalatine.

III - MESURES PROPHYLACTIQUES DES SUJETS CONTACTS

Autour du cas suspect il faut:

- **Entreprendre une enquête épidémiologique** qui vise à la recherche de nouveaux cas et à limiter la propagation de la maladie. Il est nécessaire de pratiquer, chez les sujets contacts, un prélèvement de gorge en vue de dépister les porteurs sains.

- **Administrer systématiquement l'antibioprophylaxie** aux sujets contacts:

  - Benzathine Pénicilline (Extencilline):

- pour les enfants âgés de moins de 6 ans: **600 000 UI en IM**

- pour les sujets âgés de plus de 6 ans: **1 200 000 UI** en une seule injection IM, ou érythromycine à raison de 50 mg/kg/j pendant 10 jours **en cas d'allergie à la pénicilline**

- **vacciner les sujets contacts selon leur statut vaccinal:**

  - ***chez les sujets contacts non vaccinés procéder à la vaccination immédiate*** : administration d'une dose vaccinale, plus 2 doses à 1 mois d'intervalle et 1 dose de rappel 1 an après. Le Sérum Anti Diphtérique (SAD) est administré à raison de 1000 UI

  - ***chez les sujets contacts vaccinés depuis plus d'un an et moins de 5 ans***, administrer 1 dose de rappel,

  - ***chez les sujets contacts vaccinés depuis moins d'un an***, la sérothérapie et la vaccination sont inutiles.

ANNEXE N°I

FICHE TECHNIQUE
RAPPEL CLINIQUE DE LA DIPHTERIE

1- L'ANGINE DIPHTERIQUE COMMUNE

Phase de début

- le début est en règle insidieux marqué par:

- un malaise général avec asthénie, anorexie, courbatures,
- un fébricule à 38-38,5°,
- la dysphagie est discrète
- avec abattement et pâleur
- l'examen local découvre parfois une simple angine érythémateuse et une amygdale augmentée de volume, mais très souvent il montre un enduit blanchâtre semblable à du blanc d'œuf siégeant sur l'amygdale réalisant la pellicule de BRETONNEAU. Cet enduit pultacé est facilement détachable, mais il a tendance à devenir bilatéral.

Cet aspect doit faire évoquer le diagnostic de diphtérie même chez le sujet vacciné, il exige la pratique immédiate d'un prélèvement de gorge, et l'administration du sérum antiphtérique.

A ce stade, le traitement entraîne la guérison rapide et sans complications sinon en 24 à 48 h se constitue le tableau caractéristique de la phase d'état.

Phase d'état :

C'est en règle à ce stade qu'est vu le malade et le diagnostic devient évident :

- les signes généraux persistent : abattement et pâleur intense, température à 38-38,5°, tachycardie (plus importante que celle causée par la température), oligurie discrète.
- L'examen de la gorge montre les fausses membranes caractéristiques, elles réalisent un enduit brillant blanc- nacré peu épais, lisse au début puis irrégulier et grisâtre. Elles sont cernées par un liseré rouge, non oedématié et non hémorragique. En vieillissant elles deviennent jaunâtres.

Les fausses membranes sont adhérentes au tissu sous jacent duquel on peut cependant les arracher en bloc, elles sont cohérentes, non dissociables dans l'eau, extensives et en règle bilatérales, elles envahissant rapidement l'autre amygdale, le voile du palais, le pharynx et la luette qu'elles engainent en doigt de gant. Elles se reproduisent rapidement en quelques jours après leur arrachement. Enfin elles sont riches en bacilles diphtériques (d'ou l'intérêt de leur mise en cultures avant toute antibiothérapie pour confirmation du diagnostic).

- les signes locorégionaux sont peu intenses : coryza avec jetage séreux ou mucco purulent souvent unilatéral, des adénopathies bilatérales rétro et sous maxillaires, fermes, mobiles sensibles, sans péri adénite.

- *AU TOTAL* : **le diagnostic est cliniquement évident, et peut être étayé par une notion d'épidémie ou de contage : il est confirmé par l'examen bactériologique systématique, dont on n'attend pas les résultats pour isoler le malade, le traiter en urgence, et examiner l'entourage. Un pronostic favorable peut être porté sur l'absence de signes locaux et généraux de malignité.**

Evolution :

Sous l'effet du traitement précoce l'évolution est bénigne.
En quelques heures les fausses membranes cessent de s'étendre, pour se décoller par leurs bords et tomber en 2-5 jours, la gorge est nettoyée.
La pâleur, l'asthénie persistent encore plusieurs jours.

La convalescence dure 15 jours, elle est parfois grevée d'éventuelles complications dont la survenue est toujours possible jusqu'à 90 jours après le début de l'angine.

En l'absence de traitement ou en cas de traitement tardif ou insuffisant : survenue de complications (extension au larynx surtout myocardite passage exceptionnel à l'angine maligne et décès toujours possible.

2- FORMES SYMPTOMATIQUES :

- Angine bénigne : forme fruste
  - angine purement érythémateuse
  - leur diagnostic est essentiellement bactériologique

- Formes pseudo phlegmoneuses :

Caractérisées par un oedème et une tuméfaction du pilier antérieur d'une amygdale, qui se couvre de fausses membranes. Le trismus est habituellement absent l'évolution précoce évite l'issue fatale mais souvent au prix de paralysies tardives.

3- FORMES SELON LE TERRAIN :

1) Chez le Nourrisson:

La diphtérie n'est pas rare chez le nourrisson. La localisation nasale ou adénoïdienne est habituelle, mais on peut observer une angine à fausses membranes volontiers compliquée de croup

2) Chez le sujet Vacciné :

La diphtérie n'est pas rare, elle est habituellement bénigne et non compliquée. Cependant méconnue, elle peut se compliquer.

4- FORMES COMPLIQUEES

4-1 LE CROUP OU LARYNGITE DIPHTERIQUE :

Il s'observe, essentiellement à l'âge de 2 à 6 ans, il peut être primitif, mais
survient le plus souvent au cours de l'extension locale d'une angine diphtérique. Il évolue en 3 phases successives:

- ***Phase dysphonique** marquée par :*
  - Toux rauque, voix rauque
  - Toux rauque voix éteinte
  - Toux éteinte voix éteinte
  - Signes généraux toxiques discrets
  - Coryza discret

Le diagnostic repose sur :

- la laryngoscopie, montrant les FM
- le prélèvement pharyngé et laryngé dont on n'attendra pas les résultats pour traiter le malade

- ***Phase dyspnéique** :* (24-48 h) caractérisée par :
  Une dyspnée laryngée évoluant d'abord par accès puis par grands accès entre lesquels s'instaure une dyspnée permanente. C'est une bradypnée inspiratoire avec un cornage et un tirage sus et sous sternal.

- ***Phase asphyxique** :* elle conduit à la mort.

4-2 LA MYOCARDITE :

C'est une complication majeure tant par sa fréquence que par sa gravité, elle débute généralement de façon précoce avant le 5 ème jour mais surtout entre le 5éme – 10éme jour, parfois au-delà de la 3éme semaine. Les signes cliniques sont inconstants : tachycardie ou bradycardie, assourdissement des bruits du cœur ou bruit de galop, tableau d'asystolie aigue, l'E.C.G confirme la myocardite en mettant en évidence des anomalies très souvent sans traduction clinique.

- Trouble du rythme : (tachycardie sinusale, trouble de la conduction auriculo ventriculaire, rarement l'allongement isolé du PR, trouble de la repolarisation ou inversion de l'onde T dénivellation ST).
- Elle est imprévisible dans son évolution : elle est mortelle (dans 50% des cas) peut laisser des séquelles électriques.

4-3 PARALYSIES DIPHTERIQUES :

Elles peuvent s'observer jusqu'au 90éme jour après le début de la maladie dans **un ordre chronologique : paralysie vélo palatine, paralysie de l'accommodation, paralysie des muscles du larynx et paralysie des membres**. Elle sont précoces ou tardives partielles ou généralisées.

1°) paralysie vélo platine : C'est la plus fréquente et la plus précoce

Elle est évoquée sur la constatation de troubles de la phonation et de la déglutition. Le nasonnement de la voix, le reflux par le nez des liquides ingérés avec risques de fausses routes alimentaires ou salivaires. Isolée elle évolue favorablement

2°) paralysie de l'accommodation :

Elle accompagne presque toujours la paralysie vélo platine. Elle se traduit par une gène à la vision rapprochée (pseudo presbytie) alors que la vision de loin est correcte. Elle guérit sans séquelles au bout de 10 à 15 jours.

3°) paralysie des muscles du larynx ou pharynx :

Elle se caractérise par une voix rauque et surtout des troubles de la déglutition. Parfois sont observés des accès de dyspnée ; sa gravité tient à la survenue de la broncho- pneumopathie d'inhalation.

4°) paralysie extensive des muscles respiratoires :

Elle intéresse les muscles du cou, les intercostaux les muscles abdominaux et le diaphragme. Leur évolution est émaillée d'une forte mortalité de plus de 80% par détresse respiratoire en l'absence d'assistance respiratoire.

5) paralysie des membres : réalise le tableau d'une polynévrite sensitivomotrice et s'accompagne d'une dissociation albumino- cytologique du LCR

4- 4 L'ANGINE DIPHTERIQUE MALIGNE

Elle est rarement primitive : le plus souvent sur terrain sous jacent, elle complique une angine commune qui a évolué depuis 2 à 4 jours, elle est caractérisée par :

- une fièvre à 39° à 40°
- Un état général profondément altéré d'emblée
- Une obnubilation, une prostration, ou une adynamie
- Une pâleur du visage
- Une tachycardie avec tendance à l'hypotention.

Les signes de malignité locorégionale sont :

- bouche entrouverte laissant s'écouler une salive fétide, jetage séro- sanglant bilatéral,
- cou volumineux proconsulaire déformé par des adénopathies avec périadénite,
- l'examen de la gorge confirme le diagnostic :
  les fausses membranes tapissant en une seule nappe tout le pharynx et peuvent atteindre la face interne des joues; elles forment un enduit épais et irrégulier d'odeur fétide, de couleur gris verdâtre ou noirâtre du fait d'hémorragies. Elles sont particulièrement adhérentes à la muqueuse sous jacente et leur arrachage laisse une ulcération sanguinolente. Elles sont cohérentes et remarquablement extensives. La muqueuse pharyngée est très oedématiée.
- la dysphonie et la dysphagie sont importantes.

Les signes viscéraux :

- Signes cardiaques: assourdissement des bruits du cœur avec tachycardie et hypotension
- Signes rénaux : oligurie, albuminurie quasi constante, hyperazotémie,
- Signes hémorragiques : gingivorragies, épistaxis et hématurie

Evolution:

- Parfois la mort apparaît en quelques jours soit du fait de l'extension des fausses membranes à la tranchée au larynx et aux bronches, l'issue fatale survenant par asphyxie.
- Le plus souvent l'évolution se prolonge :

Immédiatement, il ya rétrocession des signes locaux sous l'influence du traitement, les fausses membranes tombent en 4-8 jours, les adénopathies régressent plus lentement.
Par contre les signes généraux et viscéraux toxiques persistent.

Secondairement, tantôt la mort survient dans un tableau de syndrome secondaire de la diphtérie maligne, tantôt elle rejoint celle de l'angine grave traitée.

4- 5 L'ATTEINTE RENALE :

Une oligurie et une protéinurie modérées accompagnent quelques fois une angine commune, et régressent sans séquelles.

Mais une oligo-anurie, une hématurie, une hyperazotémie, une protéinurie massive prolongée signent une néphrite qui traduit une imprégnation toxique importante. Elle se voit le plus souvent dans les angines malignes.

5- AUTRES FORMES CLINIQUES :

Le coryza pseudo membraneux ou rhinite diphtérique :
Fréquent chez les nourrissons et l'enfant de 2 à 6 ans mais rare chez l'adulte. Cette diphtérie nasale accompagne une angine diphtérique dans environ 60% en zone d'endémie.

L'adénoïdite diphtérique : quasi constante dans la diphtérie pharyngée, elle peut être isolée, et se traduit par un tableau d'adénoïdite banale, dont la nature diphtérique n'est révélée que par la rhinoscopie postérieure et le prélèvement. Le traitement assure la guérison s'il est précoce sinon on peut observer la survenue d'un syndrome malin d'un croup ou de paralysie.

Diphtérie cutanée retrouvée dans les pays tropicaux : rare, elle apparaît au niveau des lésions cutanées préexistantes. Dans les cas typiques, la lésion cutanée devient douloureuse laissant s'écouler une sérosité jaunâtre, puis prend l'aspect d'un ulcère surélevé et dur, entouré d'une zone inflammatoire.

La conjonctivite diphtérique : elle s'observe surtout chez le NRS et succède d'ordinaire à une diphtérie nasale propagée par le canal lacrymal.

DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE LA DIPHTERIE

- La diphtérie est une infection grave due à **CORYNEBACTERIUM DIPHTERIAE.**

  - Corynebactérium diphtériae est un bacille à Gram positif, fragile, ayant des exigences nutritives (milieux de culture enrichis de sang ou de sérum).

- Le diagnostic de la diphtérie repose sur :
  * L'isolement et l'identification bactériologique du germe.
  * La mise en évidence de la sécrétion d'une toxine.

I- MODALITES DE PRELEVEMENT

I -1 Sites de prélèvement :

- Voies aériennes supérieures en cas d'angine pseudomembraneuse.

- Lésions cutanéo-muqueuses en cas de localisation atypique.

I -2 Matériel nécessaire :

- Ecouvillons
- Tubes de milieu de Loëffler (milieu de sérum de bœuf coagulé)
- Etuve à 35°C

I- 3 Modalités techniques :

- A l'aide d'écouvillons, faire un prélèvement de gorge, en soulevant si possible un fragment de fausses membranes (2 écouvillons par malade).

- Chez le nourrisson, faire un prélèvement nasal.

- Pour les longues distances, ensemencer directement 2 tubes de Loëffler au lit du malade (ensemencement en stries serrées).

- Indiquer sur chaque tube le n° d'enregistrement, nom, prénom du malade et la date de prélèvement.

- Le prélèvement doit être accompagné d'une :

* demande de recherche de Corynebacterium diphteriae,
* fiche de renseignements indiquant le n° d'enregistrement, le nom, prénom, âge, nature du prélèvement, signes cliniques, statut vaccinal
* la date du prélèvement.

- Acheminer le plus rapidement possible le prélèvement au laboratoire.

A défaut, déposer le tube légèrement dévissé dans une étuve à 35°C, pendant 18 à 24 H.

II- DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE LA DIPHTERIE CONDUITE A TENIR AU LABORATOIRE

1- Examen microscopique - Isolement sur milieu enrichi

- Manipuler les prélèvements avec précaution pour éviter toute contamination .

Ecouvillons

→ Gram: Corynebacterium diphteriae (C.d) se présente sous forme de fins bacilles à Gram positif avec une disposition caractéristique (palissades,lettre d'alphabet)

→ Isolement sur milieu enrichi : Milieu Loëffler, bouchon légèrement dévissé, pendant 18 à 24h, à 35°C C.d donne des colonies crémeuses en taches de bougie.

2- Isolement sur milieu sélectif : Milieu Tinsdale

- A partir des tubes de Loëffler (ceux ayant servi de milieu de transport, ou ceux ensemencés au laboratoire), faire un isolement sur milieu Tinsdale (milieu au Tellurite de potassium Thiosulfate de sodium, Cystine, Sérum de cheval).- Après incubation à 35°C pendant 48 H, C.d donne des colonies noires entourées d'un halo brun.

3 - Enrichissement et purification de la culture

- Repiquer les colonies noires avec halo brun (bacilles à Gram positif à l'examen
microscopique) sur gélose au sang cuit (GSC ou gélose chocolat). Après 18 à 24 h
d'incubation à 35°C, D.d donne des colonies légèrement grisâtres en tête d'épingle

4 - Identification biochimique et diagnostic d'espèce

- A partir d'une culture pure, faire une suspension laiteuse (6 MAC FARLAND) et effectuer la galerie d'identification suivante :

• Gram

• Recherche de la catalase

• Recherche de la nitrate réductase (10 gouttes de suspension)

• Recherche de l'uréase sur milieu de Christensen (ensemencement en stries serrées de la partie supérieure de la gélose, le culot servant de témoin).

• Recherche de l'indole, sur eau peptonée exempte d'indole (10 gouttes de suspension)

• Recherche de la gélatinase (un film de gélatine dans 1 ml de suspension bactérienne)

• Etude de la fermentation des sucres
Elle se fait sur milieu CTA (Cystine Trypticase Agar) ou sur milieu MEVAG sans sucre,additionné de 10 % de sérum de cheval et de 1 % d'hydrate de carbone ajouté stérilement.

Les sucres étudiés sont : le glucose, le maltose, le saccharose et le glycogène
Inoculer en piqûre la partie supérieure du milieu d'étude de ces sucres.

*** Incuber la galerie pendant 18 à 24 h à 35°C

5- Etude de la sensibilité aux antibiotiques

- Milieu utilisé : Mueller Hinton

- Inoculum : 0,5 Mac Farland.

- Antibiotiques testés : -

•Pénicilline / Ampicilline /Erythromycine

ATTENTION ! RAPPEL : ATTENTION ON NE PEUT FAIRE UN DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE DIPHTERIE sur la visualisation de bacilles à Gram positif corynéformes à l'examen microscopique après coloration de Gram d'un prélèvement de gorge (il existe de nombreuses corynébactéries non pathogènes)

ON NE PEUT FAIRE UN DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DE DIPHTERIE sur l'unique existence d'une culture bactérienne en milieu de Loëffler (ce milieu n'est pas sélectif et de nombreuses bactéries y poussent).

ATTENTION : D'autres germes peuvent pousser sur milieu Tinsdale et donner des colonies noires :

* **Cocci à Gram positif** : Staphylocoques,Streptocoques .

* **Bacillesà Gram positif** : Corynébactéries saprophytes.
* **Levures.**

IMPORTANT: Faire un Gram à partir de toute culture sur milieu Tinsdale.

REMARQUE : A défaut de milieu Tinsdale, il est possible d'utiliser un milieu gélose au sang avec ou sans inhibiteurs.

Refaire un prélèvement de contrôle au bout de sept jours d'hospitalisation. Procéder de la même manière que pour le prélèvement au 1er jour d'hospitalisation.

III – DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

1-Prélèvements:

Deux prélèvements doivent être effectués sur tube sec et stérile

-Le premier au jour j0 : 5 ml de sang total

- Le deuxième prélèvement au jour j15 : 5ml de sang total

2- Analyse :

Les prélèvements doivent être acheminés à l'Institut Pasteur d'Alger, laboratoire de bactériologie médicale où s'effectuera l'analyse.

Les fiches de renseignements doivent être conscieusement remplies afin d'interpréter les résultats (précisez les dates des vaccinations et dates des rappels).

وزير الصحة و السكان و إصلاح المستشفيات

13 FEB 2007

عمار تو

ملاحظة : في وسط تنسدل ، يمكن استعمال وسط غرانتي بالدم مع أو بدون مثبطات .

يعاد أخذ العينات الخاصة بالمراقبة بعد سبعة أيام من الاستشفاء لا تعتمد نفس الطريقة إلا في حال القيام بأخذ عينة في اليوم الأول من الاستشفاء .

التشخيص المصلي :

1- أخذ العينات :

يجب أخذ عينتين (02) في أنبوب جاف و معقم .

- الأول من اليوم 0 : 5 ملل من الدم الكامل ،
- العينة الثانية في اليوم الخامس عشر (15) : 5 ملل من الدم الكامل .

2 – التحاليل :

يجب أن ترسل العينات المأخوذة إلى معهد باستور بالجزائر ، مخبر علم البكتيريا الطبية أين تقام التحاليل .

يجب الحرص على ملأ بطاقات المعلومات بغية تفسير النتائج (تحديد تواريخ المعالجة بالمصل و التلقيح + تاريخ الإعادة) .

السكان و إصلاح المستشفيات

3 FEB 2007

4 – التشخيص البيوكميائي و تشخيص النوع :

- عن طريق وسط زراعة مطهر، يستخرج معلق يشبه الحليب (6 مكفارلاند) و إقامة عملية التشخيص التالية :

- الغرام ،
- البحث عن الكاتالاز ،
- البحث عن النترات المختزلة (10 قطرات من المعلق) ،
- البحث عن اليورياز في وسط كرستنسن (وضع في شكل حزات شديدة الإحكام للجزء العلوي من الغراء و يستخدم العقب كدليل) .
- البحث عن الإندول ، على ماء ببتونية خالية من الإندول (10 قطرات من المعلق) ،
- البحث عن الجيلاتيناز (فلم من الجيلاتين في 1 ملل من المعلق البكتيري) ،
- دراسة تخمر السكريات .

و تتم في وسط كريستين تريتيكاز أغار أو في وسط MEVAG من دون سكر ، يضاف إليه 10% من مصل الحصان و 1% من هيدرات الكربون تضاف عن طريق التعقيم .

أنواع السكريات المدروس هي : سكر العنب (الغلوكوز) ، المالتوز ، الريبوز ، الغليكوجين .

يضاف في الحقنة الجزء العلوي من وسط الدراسة لهذه السكريات .

*** يحضن الأنبوب من 18 إلى 24 ساعة في 35° .

5 – دراسة الحساسية للمضادات الحيوية :

- **الوسط المستعمل :** مولير هينتون ،
- **الزرعة :** 0.5 ماك فارلاند ،
- **المضادات الحيوية المجربة :** البنسلين ، الأمبسلين ، الإرترومسين .

حذار! تذكير : لا يمكن إجراء تشخيص بكتيري للخناق عند رؤية العصيات إيجابية الغرام عند الفحص بالمجهر بعد تلون الغرام لعينة من الحلقوم (هناك وتديات عديدة غير ممرضة) .

لا يمكن إجراء تشخيص بكتيري خناقي فقط على أساس وجود وسط زرع بكتيري في وسط لفلر (إن هذا الوسط ليس انتقائيا و العديد من البكتيريا تنبت فيه) .

حذار : يمكن لجراثيم أخرى أن تنبت في وسط تنسدل و تنتج مستوطنات سوداء .

* مكورات إيجابية الغرام : العنقوديات و العقديات ،
* عصيات إيجابية الغرام : الوتدية الرمية ،
* الخمائر .

هام : استخراج الغرام من كل زرع في وسط تنسدل .

- يحدّد على كل أنبوب رقم تسجيل المريض و لقبه و اسمه و تاريخ أخذ العينة .

- يجب أن ترفق عملية أخذ العينة بما يلي :
- طلب البحث عن الوتدية الخناقية ،
- **بطاقة المعلومات تحمل رقم التسجيل ، اللقب ،الاسم ،السن ، طبيعة أخذ العينة ، الأعراض العيادية ، حالة التلقيح ،**
- تاريخ أخذ العينة.

- إرسال العينة المأخوذة بأسرع ما يمكن إلى المخبر .

و إن تعذر ذلك، يوضع الأنبوب مغلق قليلا في المعقمة بـ35 °، لمدة 18 إلى 24 ساعة.

ثانيا / التشخيص البكتيري للخناق

السلوك الواجب إتباعه في المخبر

1 – الفحص المجهري – العزل في الوسط المشبّع :

- التعامل مع العينات المأخوذة بحذر لتفادي أي عدوى .

الغرام : تكون الوتدية الخناقية في شكل عصيات رفيعة إيجابية الغرام مع ترتيب خاص (حبالك ، حروف) .

المسحات

العزل في وسط مشبع : وسط لفلر ، سدادة مغلقة قليلا ، خلال 18 إلى 24 ساعة بـ35 ° ، الوتدية الخناقية تنتج مستوطنات قشدية تشبه البقع التي تتركها الشموع

2 – العزل في الوسط المختار : وسط تنسدال :

- باستعمال أنابيب لفلر (الأنابيب التي استخدمت في عملية النقل أو تلك التي ركبت في المخبر) ، يتم العزل في وسط تنسدال (وسط من تلوريت البوتاسيوم و سلفات الكبريت ، السستين ، مصل الحصان) .

- بعد حضانة بـ35 ° لمدة 48 ساعة ، الوتدية الخناقية تنتج مستوطنات سوداء تحيط بها هالة بنية .

3 – تشبيع وسط الزرع و تطهيره :

- يعاد زرع المستوطنات السوداء بالهالة البنية (عصيات إيجابية الغرام لدى الفحص بالمجهر) في غراء من الدم الجديد. و بعد 18 إلى 24 ساعة من الحضانة بـ35 ° ، تعطي مستوطنات تميل إلى اللون الرمادي بعض الشيء و في شكل رأس دبوس .

الخناق الذي يصيب الجلد و الذي نجده في البلدان الاستوائية: إنه نادر و يظهر على مستوى الجروح الجلدية السابقة. و في الحالات الخاصة، يصبح الجرح على الجلد مؤلما تسيل منه مصلية تميل للصفرة ثم تأخذ شكل قرحة حادة يحيط بها التهاب.

الرمد الخناقي : يلاحظ خاصة لدى الرضيع و يؤدي في العادة لخناق الأنف الذي ينتشر عبر القناة الدمعية .

التشخيص البكتيري للخناق

- الخناق مرض خطير تتسبب فيه **الوتدية الخناقية** .
- الوتدية الخناقية هي عصية إيجابية الغرام ، هشة و بحاجة إلى غذاء في وسط زرع مشبع بالدم أو المصل) .

- و يرتكز تشخيص الخناق على :
* العزل و التشخيص البكتيري للجرثوم ،
* التحقق من إفراز السمّين .

أولا - كيفيات أخذ العينات :

1 – 1 مواضع أخذ العينات:

- المسالك الهوائية العلوية في حالات التهاب اللوزتين بغشاء كاذب.
- جروح جلدية مخاطية في حالة تموضع لا نمطي .

1 – 2 الأدوات الضرورية:

- الماسحات ،
- أنابيب وسط لفلر (وسط مصل بقري مخثر)،
- معقمة بـ 35 °.

1 – 3 - الكيفيات التقنية :

- تستعمل الماسحات لأخذ عينة من الحلقوم مع انتزاع جزء من أغشية كاذبة إذا أمكن (ماسحتان (02) لكل مريض) .
- بالنسبة للرضيع ، تأخذ عينة من الأنف ،
- بالنسبة للمسافات الطويلة ، يركب أنبوبا لفلر مباشرة على فراش المريض (يتم الوضع عن طريق حزّات مشدودة بإحكام) .

- يؤكد فحص الحلقوم التشخيص التالي :

الأغشية الكاذبة التي تغطي في طبقة واحدة كل البلعوم و يمكن أن تمس الجوانب الداخلية للخدود. و تشكل دهنا كثيفا و غير منسجم رائحته كريهة ، رمادي اللون يميل للخضرة أو السواد من جراء النزيف المتكرر . و تمتاز خاصة بالالتصاق بالغشاء المخاطي المتواجد تحتها و يخلف نزعها آثارا تقرح دموي اللون. إنها متناسقة و متمددة بشكل واضح . و يكون الغشاء المخاطي البلعومي وذمي للغاية .

- عسر التصويت و عسر البلع شديدين .

و تكون الأعراض الحشوية كالتالي :

- أعراض قلبية: إصمام أصوات القلب مع تسرع القلب و نقص الضغط الشرياني،
- أعراض كلوية : قلة البول ، البيلة الألبومينية شبه الثابتة ، و الآزوتمية المفرطة ،
- أعراض نزيف : نزيف لثوي ، رعاف ، بيلة دموية .

تطور المرض :

- أحيانا ، يؤدي المرض إلى الوفاة بعد بضعة أيام بسبب تمدد الأغشية الكاذبة إلى القداد و الحنجرة و القصبات ، و يكون الاختناق سببا في الوفاة .
- في غالب الأحيان تمتد فترة تطور المرض :

تتراجع الأعراض الموضعية فورا تحت تأثير العلاج ، تسقط الأغشية الكاذبة في حدود أربعة أيام إلى ثمان (4 – 8) ، و يتقلص تضخم الغدد بشكل بطيء . و في المقابل ، تبقى الأعراض العامة و الحشوية السمّية دائمة .

و تحدث الوفاة في بعض الأحيان بسبب أعراض ثانوية للخناق الخبيث و أحيانا أخرى بسبب التهاب اللوزتين الخطير .

4 – 5 : إصابة الكلى

تصاحب قلة البول و البيلة البروتينية المعتدلتين في بعض الأحيان حالة التهاب لوزتين عادي و تتراجع دون تخليف آثار .

لكن قلة الزرام و البيلة الدموية و الآزوتمية المفرطة و البيلة البروتينية الكثيفة المطولة تشير إلى وجود التهاب الكلوة ناتج عن إشراب سمي كبير . و نجدها في الغالب في التهابات اللوزتين الحادة .

5 – الأعراض العيادية الأخرى :

الزكام الغشائي الكاذب أو التهاب الأنف الخناقي :

يكثر عند الرضع و الأطفال من 2 إلى 6 سنوات لكنه نادر لدى البالغ . و يصاحب الخناق الأنفي التهاب لوزتين خناقيبالنسبة الى 60 % من الحالات في مكان توطن المرض .

الغذانية الخناقية : شبه دائمة في حالة الخناق البلعمي ، و يمكن عزلها ، و تتجسد في شكل غذانية بسيطة لا تتجلى طبيعتها الخناقية إلا باستعمال تنظير الأنف الخلفي و أخذ العينات . و تضمن المعالجة الشفاء إذا قدمت في وقت مبكر و إلا فإننا سوف نلاحظ حدوث متلازمة خبيثة لخانوق أو لشلل .

1 / الشلل الحفاقي الحنكي : هو الأكثر انتشارا و الذي يصيب المريض مبكرا :

و نتحدث عن هذا النوع من الشلل عند ملاحظة اضطرابات في إخراج الصوت و البلع . فن الصوت، ارتداد السوائل التي لا تدخل المعدة عن طريق الأنف مع التعرض إلى أخطار المرور الخطأ للأغذية أو اللعاب. و عندما يكون معزولا، فإن ذلك يساعد على تطوره بشكل كبير.

2 / شلل التكيف:

إنه يصاحب في غالب الأحيان الشلل الحفاقي الحنكي. و يأتي في شكل اضطراب في النظر عن قرب (قدع كاذب) أما النظر عن بعد فهو سليم . و هو يشفى دون بقاء الآثار في حدود 10 إلى 15 يوما .

3 / شلل عضلات الحنجرة و البلعوم :

ويتميز بصوت خشن و خاصة باضطرابات في البلع . في بعض الأحيان، تلاحظ حالات عسر تنفس حادة. و تعود خطورة هذا النوع من الشلل إلى حدوث إصابات بالالتهاب القصبي الرئوي عند الاستنشاق .

4 / الشلل الممتد إلى العضلات التنفسية:

و هو يخص عضلات الرقبة، ما بين الضلوع، عضلات البطن و الحاجب. ويكون تطوره مصحوبا بنسبة كبيرة من الوفيات تزيد عن 80 % يتسبب فيها عسر التنفس في غياب المساعدة على التنفس .

5 / شلل الأطراف:

و يأخذ صورة التهاب الأعصاب الحسية الحركية و يصاحبها تفارق البوميني خلوي لسائل الدماغ و العمود الفقري.

4 –4 التهاب اللوزتين الخناقي الخبيث :

نادرا ما يكون بدائيا: يكون غير ملحوظ في معظم الأحيان و يتسبب في تفاقم التهاب لوزتين عادي حدث منذ يومين (02) إلى أربعة (04) أيام. و تتميز بالأعراض التالية :

- حمى من 39° إلى 40°،
- حالة متدهورة كثيرا،
- دغش ، إعياء ، أو وهن ،
- شحوب الوجه،
- تسرع القلب مع ميول إلى نقص الضغط الشرياني .

و تتمثل الأعراض المحلية و العامة فيما يلي :

- فم مفتوح يسيل منه لعابكريه الرائحة و سيلان دمي مصلي من الجانبين،
- تورم عنقي ضخم مشوه بسبب تضخم الغدد مع التهاب حول الغدة ،

4 – أشكال معقدة :

4 – 1 الخناق أو التهاب الحنجرة الخناقي :

يلاحظ ذلك خصوصا لدى الأطفال من سنتين (02) إلى ست (06) سنوات . و قد يكون في مرحلته الأولى و لكن يحدث غالبا عند التوسع المحلي لالتهاب اللوزتين الخناقي . و يتطور حسب ثلاث (03) مراحل متتابعة :

- **مرحلة عسر في الصوت و تتميز بـ :**
  - سعال خشن و صوت خشن ،
  - ثم ، سعال خشن و صوت واه ،
  - سعال واه و صوت واه ،
  - و أخيرا ، أعراض عامة سامة و خفيفة ،
  - زكام خفيف .

يرتكز التشخيص على :
- تنظير الحنجرة المبدي لغشاء كاذب،
- أخذ عينات من البلعوم و الحنجرة دون أن ننتظر نتائجها لمعالجة المريض.

- **مرحلة عسر التنفس :**(24 إلى 48 ساعة) و تتميز بما يلي :

عسر التنفس على مستوى البلعوم يتطور في أول الأمر بنوبة ثم بنوبات ينشأ خلالها عسر تنفس دائم . و يتمثل ذلك في بطء في التنفس عند الاستنشاق مرفق بضباح و جذب تنفسي من تحت و فوق القص.

- **مرحلة الاختناق :** تؤدي إلى الوفاة .

4 – 2 التهاب عضل القلب:

يمثل مضاعفة كبيرة سواء من حيث نسبة الحدوث أو من حيث الخطورة. و يبدأ بصفة مبكرة على العموم قبل اليوم الخامس لا سيما بين اليوم الخامس و اليوم العاشر ، و يتعدى في بعض الأحيان الأسبوع الثالث . و تكون الأعراض العيادية متغيرة : تسرع القلب أو بطء القلب ، إصمام نبضات القلب ،سماع نبض سريع للقلب ،استرخاء حاد للقلب ، مخطط كهربائية القلب يؤكد التهاب عضل القلب مع بروز تشوهات في غالب الأحيان دون تفسير عيادي .

- اضطراب في نبضات القلب (تسرع القلب الجيبي) ،
- اضطراب في التوصيل الأذيني البطيني ، (التمدد النادر و المعزول PR)
- اضطراب في إعادة الاستقطاب (بسط أو انقلاب الموجة T أو زوال تسوية ST) .

تطوره غير ملحوظ : و هو مرض قاتل بنسبة 50 % من الحالات و قد يترك آثارا كهربائية .

4 – 3 تشللات خناقية :

يمكن ملاحظتها إلى غاية اليوم التسعين (90) بعد بدء المرض حسب **الترتيب الزمني : شلل حنكي ، شلل التكيف ، شلل عضلات الحنجرة و شلل الأطراف .**
و تحدث بصفة مبكرة أو متأخرة ، جزئية أو عامة .

- الأعراض المحلية / العامة قليلة الحدة : زكام بسيلان مصلي أو مخاطي قيحي من جانب واحد في معظم الأحيان و تضخمات الغدد ثنائية الجوانب خلفية وتحت الفك ، صلبة ، متنقلة و حساسة و دون التهاب حول الغدة .
- **عموما : يكون التشخيص واضحا من الناحية العيادية و يمكن أن يعتمد على فكرة الوباء أو ناقلة العدوى : و يكشف عنه بفحص جرثومي آني ، بحيث لا ننتظر النتائج لعزل المريض و إنما معالجته بصفة مستعجلة و فحص المحيط . عند عدم وجود أعراض خباثة محلية و عامة ، يمكن التحدث عن سلامة الشخص .**

التطور:

إن العلاج المبكر يجعل تطور المرض غير خطير. فبعد بضع ساعات، تتوقف الأغشية الكاذبة عن التوسع لتنفصل من الجوانب و تسقط خلال يومين (02) إلى خمسة (05) أيام. و من ثم ، يصبح الحلقوم نظيفا .
و يستمر الشحوب و الوهن لعدة أيام.

أما فترة النقاهة، فتدوم خمسة عشر (15) يوما و في بعض الأحيان يحتمل حدوث مضاعفات خلال تسعين (90) يوما بعد بداية التهاب اللوزتين.

في غياب العلاج أو في حالة العلاج المتأخر أو الناقص: حدوث مضاعفات (توسع الحنجرة خصوصا التهاب عضل القلب) و تحول استثنائي إلى التهاب اللوزتين الخبيث و تبقى الوفاة محتملة دائما.

2 – الأشكال العرضية :

- التهاب اللوزتين غير الخطير ، الشكل الصعب،
  - التهاب اللوزتين الحمامي ،
  - يرتكز تشخيصهما على الجانب الجرثومي .

- الأشكال الفلغومنية الكاذبة :

تتميز بخزب و تورم الدعامة الأمامية للوزة التي تغطى بأغشية كاذبة . و عادة ما لا يوجد كزاز فكي، و التطور المبكر يجنب نهاية قاتلة و لكن غالبا ما تكون هناك تشنلات متأخرة .

3 – أشكال حسب الحالات :

1 / لدى الرضيع :

الخناق يصيب حتى الرضيع . و يصيب عادة المواقع الأنفية أو الغدانية و لكن من الممكن ملاحظة التهاب اللوزتين بأغشية كاذبة مرفوقة بخانوق .

2 – لدى الشخص الملقح:

إن الخناق ممكن الحدوث و عادة ما يكون غير خطير و دون مضاعفات. و إن لم يتم التعرف عليه، يمكن أن تكون هناك مضاعفات.

الملحق الأول

بطاقة تقنية
إعادة عيادية بخصوص الخناق

1 – التهاب اللوزتين الخناقي العادي:

مرحلة البداية :

- تتميز البداية بتطور غير ملحوظ و تتسم بما يأتي :

- تعب عام مع وهن و فقدان للشهية و آلام في الأطراف ،
- حمى من 38° إلى 38.5°،
- عسر خفيف في البلع ،
- مع خور و شحوب ،
- يكشف الفحص الموضعي في بعض الأحيان عن التهاب حمامي بسيط للوزة و انتفاخ اللوزتين ، و لكن غالبا ما يبرز دهنا يميل إلى البياض يشبه بياض البيض فوق اللوزة محدثا جليدة "برطنو" . و هذا الدهن اللبي قابل للفصل بسهولة و لكن يميل للتجزأ إلى قسمين .

تستدعي الوضعية تشخيص الخناق حتى لدى الشخص الملقح . و تفرض الأخذ المباشر لعينة من الحنجرة و وصف المصل المضاد للخناق .

بذلك، يأتي العلاج بالشفاء السريع و دون مضاعفات و إلا تشكل الجدول المميز لمرحلة حالة المرض من 24 إلى 48 ساعة.

مرحلة المرض :

يعاين المريض في هذه المرحلة و يصبح التشخيص واضحا:

- استمرار الأعراض العامة: خور و شحوب شديد درجة حرارة من 38° إلى 38.5°، تسرع القلب(أكثر من التسرع الذي تتسبب فيه الحرارة)، قلة البول،
- يوضح فحص الحلقوم الأغشية الكاذبة المميزة ، و هي تحدث دهنا لامعا أبيض لؤلئي و قليل الكثافة ، ناعما في البداية ثم يصبح غير متناسق و رماديا . و يحيط بها شريط أحمر ، غير ذمي و غير نزفي . و بعد مدة طويلة ، تصبح مائلة إلى اللون الأصفر.

إن الأغشية الكاذبة تكون لاصقة بالنسيج التحتاني و بإمكاننا نزعها عنه كلية . و تكون متناسقة ، و غير قابلة للانفصال في الماء و قابلة للاتساع وتصيب الجانبين و تغزو بسرعة اللوزة الأخرى، و غشاوة الحنك، و البلعوم و لحمة أقصى الحلق التي تغمدها كأصبع قفاز و تعاود الظهور بسرعة خلال أيام بعد نزعها . و أخيرا ، تحمل الكثير من عصيات خناقية (مما يستدعي وضعها قيد الزراعة قبل المعالجة بالمضادات الحيوية للتأكد من التشخيص) .

ثالثا - تدابير وقائية لفائدة الأشخاص المتصلين بالمريض :

بالنسبة لحالة مشبوهة، يجب:

- **القيام بتحقيق وبائي يهدف إلى البحث عن حالات جديدة و الحد من انتشار المرض .** و من الضروري أخذ عينات من حلقوم الأشخاص المتصلين بالمريض قصد الكشف عن أي حامل سليم،
- **الوصف الآلي للمضادات الحيوية الوقائية** للأشخاص المتصلين بالمريض ،

- بنزاتين بنسلين (إكستونسلين).

- بالنسبة للأطفال أقل من ست (06) سنوات : **600.000 وحدة داخل العضلات ،**

- بالنسبة للأشخاص البالغين ستة (06) سنوات فما فوق: **1200.000 وحدة في حقنة** واحدة داخل العضلات ، أو الإيرترومسين بنسبة 50 مغ / كغ / اليوم خلال عشرة (10) أيام **في حالة الحساسية للبنسلين .**

- **تلقيح الأشخاص المتصلين بالمريض حسب حالتهم التلقيحية،**

- **لدى الأشخاص المتصلين غير الملقحين، إجراء تلقيح فوري:** وصف جرعة تلقيحية، أكثر من جرعتين بفاصل شهر و جرعة واحدة كإعادة سنة بعد ذلك. يوصف المصل المضاد للخناق بنسبة 1000 وحدة .

- **لدى الأشخاص المتصلين الملقحين منذ أكثر من سنة و أقل من خمس (05) سنوات،** توصف جرعة واحدة كإعادة.

- **لدى الأشخاص المتصلين بالمريض الملقحين منذ أقل من سنة،** لا داعي للمعالجة المصلية و التلقيح.

13 FEB 2007

وزير الصحة و السكان و إصلاح المستشفيات

عمار تو

- لدى الطفل من 2000 إلى 5000 وحدة عالمية / كغ أي من 20 000 إلى 40 000 وحدة عالمية في جرعة كاملة.

- لدى البالغ من 40 000 إلى 60 000 وحدة عالمية دون تجاوز 120 000 وحدة عالمية.

ثانيا- 2 -2 العلاج بالمضادات الحيوية:

تستدعي في أول الأمر البنسلين ج:

- 100 000 / وحدة عالمية /كغ / اليوم في حقنتين اثنتين داخل العضلات لدى الطفل خلال عشرة (10) أيام.

- مليوني (2) وحدة / اليوم في حقنتين (2) داخل العضلات لمدة عشرة (10) أيام لدى البالغ.

في حالة الحساسية للبنسيلين و الإيريترومايسين :

- لدى الطفل: 50 مغ/ كغ / اليوم في أربع (4) جرعات خلال عشرة (10) أيام.

- لدى البالغ: غرامين(2) / اليوم في جرعتين (4) خلال عشرة(10) أيام.

ثانيا – 2 -3 الخضوع للراحة التامة على السرير:

إن الراحة ضرورية بسبب خطر محتمل لإلتهاب عضل القلب و الوفاة المفاجئة. **و تكون المدة 21 يوما بالنسبة إلى التهاب اللوزتين الخناقي العادي و تزيد مدتها عند المضاعفات.**

ثانيا- 2 - 4 التلقيح (سمون معطل خناقي):

عند الشفاء، يجب على المريض الخضوع للتلقيح ضد الخناق بغض النظر عن وضعية تلقيحه السابقة لأن المرض يعاود الحدوث ثانية. لذلك ، يخضع المريض إلى تلقيح أولي من ثلاث (3) جرعات ضد الخناق و الكزاز لدى الطفل أو لدى البالغ بفاصل شهر و إعادة سنة من بعد.

ثانيا - 2 – 5 – علاج المضاعفات :

في حالة خانوق (التهاب الحنجرة الخناقي) ، يجب إرفاق العلاج بقشرانيات داخل الوريد أو داخل العضلات (هميسكسنيات من هدروكورتزون أو دكساميتازون) .
في حالة تفاقم الخطر أو عدم التحسن بعد بضع ساعات (06 ساعات) يجب النقل للإنعاش للتنبيب أو القيام ببضع الرغامى .

في حالة التهاب عضل القلب أو حالات الشلل (حفافي حنكي أو تنفسي) : يجب إجراء العلاج في وسط متخصص . و يجب توقيف كل تغذية عن طريق الفم في حالة شلل حفافي حنكي .

أولا - ظروف إجراء التشخيص (طبقا للملحق الأول - تذكير عيادي)

من الضروري إجراء كشف مبكر عن المرض يجب الرجوع إليه:

- بصفة آلية عند حدوث التهاب اللوزتين بغشاء كاذب،
- عند التهاب للوزتين و كل التهاب للحنجرة لدى شخص مريض أو غير ملقح ضد الخناق يحدثان في وسط وبائي أو بصفة متفرقة،
- عند كل التهاب للوزتين يكون مرافقا بأعراض منذرة بحدوث المرض: وهن، شحوب، حمى لا تتجاوز 38.5 ° و تسرع القلب.

لا يجب أن تغني عملية التلقيح ضد الخناق عن إجراء تشخيص له

ثانيا / التدابير الواجب اتخاذها أمام حالة مشبوهة للخناق:

ثانيا – 1 - يجب القيام مباشرة بما يلي :

1- استشفاء و عزل المريض، الخضوع للراحة التامة على السرير و المراقبة العيادية.
2- أخذ عينة من الحلقوم (الملحقان الأول و الثاني التشخيص البكتيري) قبل كل علاج للتعرف على الجرثوم.
3 - وصف العلاج المصلي (مصل مضاد للخناق) للقضاء على السمين الموجود و العلاج بالمضادات الحيوية من أجل القضاء على الجرثوم (طبقا للفصل تدابير علاجية).
4 - التصريح وجوبا بالمرض حسب كيفيات التبليغ عن الأمراض ذات التصريح الإجباري (قرار رقم 179/وص/ الديوان المؤرخ في 17 نوفمبر 1990 و الذي يحدد قائمة الأمراض ذات التصريح الإجباري و كيفيات التبليغ عنها) .
5- التلقيح بعد الشفاء

ثانيا – 2 - التدابير العلاجية:

يهدف العلاج الشافي إلى القضاء على السمين الموجود (بالعلاج المصلي) و التخلص من الجرثوم (عن طريق العلاج بالمضادات الحيوية) و الوقاية من حدوث مضاعفات.
يجب تقديم العلاج على جناح السرعة و عند أي شك و قبل الفحص الجرثومي.

ثانيا – 2 – 1 العلاج المصلي:

يوصف المصل المضاد للخناق حسب طريقة بسردكة BESREDKA (لتفادي صدمة تأقية) و المتمثلة في حقن تحت الجلد 0.1 مل من المصل المضاد للخناق ، ثم 0.25 مل بعد 15 دقيقة . و تحقن نصف الجرعة المتبقية إذا لم ينتج رد فعل خلال 15 دقيقة تحت الجلد و النصف الآخر داخل العضلات.

تقدم الجرعات حسب وزن المريض و خطورة المرض. و تكون كالآتي:

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة الصحة و السكان و إصلاح المستشفيات

رقم ...012... و ص س / م / الوقاية

منشور وزاري رقم مؤرخ في 13 FEB 2007

المرسل إليهم :

- السيدة و السادة الولاة للإعلام
- السيدات و السادة مدراء المراكز الإستشفائية الجامعية و مدراء المؤسسات الإستشفائية للتنفيذ
- السيدة و السادة مدراء الصحة و السكان للمتابعة و تبليغ مدراء القطاعات الصحية

الموضوع : المرجع / المنشور رقم 755 المتعلق بالسلوك الواجب إتباعه أمام حالة مشبوهة للخناق .

عرفت الجزائر ، بعد فترة اختفاء ، عودة ظهور الخناق (الدفتيريا) في شكل حالات انفجار وبائي خلال سنة 1993 (563 حالة و 31 وفاة) و حدوث وبائين كبيرين سنة 1996 (107 حالة) و سنة 1997 (30 حالة) مسّت كل الولايات تقريبا.

و لقد طالت الحالات المبلّغ عنها السكان الرحّل في سنة 2003 (07 حالات في تيارت) ، و في سنة 2004 (08 حالات في تمنراست) و في سنة 2005 (4 حالات في ميلة و 03 حالات في أدرار). و تعود هذه الظاهرة لعدة أسباب لا سيما تحركات السكان على الحدود الجنوبية للبلاد و نقص التغطية التلقيحية و تراجع الحماية الوقائية عند هؤلاء السكان . و إذا كانت التدابير المتخذة قد سمحت بالتحكم في الوباء ، تبقى الجزائر رغم ذلك معرّضة لظهور بؤر جديدة للوباء .

و عليه ، من الضروري الاستمرار في التغطية التلقيحية بأقصى مستوى ممكن بالنسبة لكل التلقيحات الإجبارية .

يذكّر هذا المنشور المحيّن بالكيفيات العملية للسلوك الواجب إتباعه أمام حالة مشبوهة للخناق المنصوص عليها في المنشور رقم 755 و ص س / م و / م ف و ع المؤرخ في 31 أكتوبر 1994.

و في إطار تعزيز المراقبة و تحسين عملية التكفل بحالات الإصابة بالمرض، يجب العمل على النشر الواسع لهذا المنشور على جميع المستخدمين الصحيين المعنيين على كل المستويات.

مدير الوقاية

ANDS