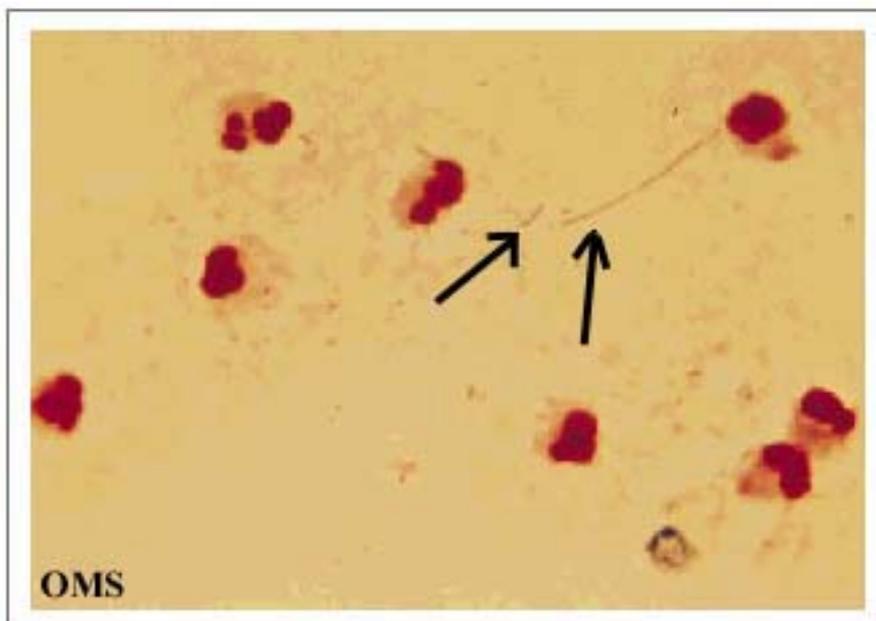


Haemophilus

Mise en garde : le texte ci-dessous est particulièrement adapté aux BTS Analyses de biologie médicale et DUT ABB.

1. MORPHOLOGIE CLASSIFICATION ET HABITAT

C'est *Haemophilus influenzae* qui a été la première bactérie de ce genre à être décrite : elle fut isolée du tractus respiratoire et l'on crut qu'elle était responsable de la grippe d'où le mot influenzae.



Haemophilus dans un LCR (méningite)

La culture de ces bactéries nécessite du sang : *Haemophilus* = qui aime le sang. Elle est toutefois faible sur gélose au sang frais.

Les *Haemophilus* sont des **symbiotes (parasites) obligatoires des muqueuses** (tractus respiratoire, bouche, vagin, intestin) possédant une grande spécificité d'hôte. *H. influenzae* est surtout rencontré au niveau respiratoire. Il peut tout de même être trouvé dans les selles et au niveau vaginal ce qu'il n'est pas facile de démontrer techniquement vu l'importance des flores associées.

La spécificité d'habitat est d'ailleurs parfois liée aux biotypes.

	oropharynx	appareil génito-urinaire	rectum
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype I	rare	rare	rare
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype II	nombreux	sexuel	présent
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype III	nombreux	sexuel	présent
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype IV	sexuel	présent	rare
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype V	rare	rare	rare
<i>Haemophilus influenzae</i> biotype VI	rare	rare	nombreux
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> biotype I	nombreux	présent	nombreux
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> biotype II	nombreux	nombreux	nombreux
<i>Haemophilus parainfluenzae</i> biotype III	nombreux	présent	présent

La grande caractéristique des *Haemophilus* est leur exigence en un ou deux facteurs de croissance généralement absents des milieux usuels (mêmes riches) :

- le facteur V ou **NAD-NADP** et/ou
- le facteur X ou **hémine** (protoporphyrine + Fer II)

Les *Haemophilus* importants sont en pathologie médicale :

- ***influenzae*** (besoin en NAD et hémine)
- ***parainfluenzae*** (besoin en NAD, pas de besoin en hémine)
- ***ducreyii*** : agent de MST, le chancre mou, que l'on ne rencontrera que très rarement avec peu de chances de culture tant celle-ci est fastidieuse et peu productive. Ce dernier devrait être rapidement déclassé dans un nouveau genre car il n'a rien à voir avec les *Haemophilus*. (4 % d'homologie DNA-DNA). Le traitement met en jeu d'azithromycine, la ceftriazone, la ciprofloxacine ou l'érythromycine en 2016.

Plus globalement, on rassemble *Haemophilus*, *Pasteurella* et *Actinobacillus* dans la famille des **Pasteurellaceae** sur la base d'hybridations DNA-DNA. Il est probable que de profonds remaniements surviendront, **l'exigence en facteurs de croissance ne pouvant être une méthode taxonomique fiable**. Des bactéries actuellement classées dans d'autres genres se verront incluses dans les *Haemophilus* sans pour autant avoir des besoins en NAD et hémine et inversement... Il existe d'ailleurs déjà des *Haemophilus* non exigeants en NAD et/ou hémine.

Class III : Gammaproteobacteria	Ordre III : Xanthomonadales	famille des Xanthomonadaceae (avec les genres <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Xanthomonas</i> ...)
	Ordre V : Thiotrichales	(famille III : Francisellaceae)
	Ordre VI : Legionellales	famille des Legionellaceae (avec le genre <i>Legionella</i>)
		famille des Coxiellaceae (avec le genre <i>Coxiella</i>)
	Ordre IX : Pseudomonadales	famille des Pseudomonadaceae (avec les genres <i>Pseudomonas</i> , <i>Morococcus</i> ...)
		famille des Moraxellaceae (avec les genres <i>Moraxella</i> , <i>Acinetobacter</i> ...)
	Ordre X : Alteromonadales	famille des Alteromonadaceae (avec les genres <i>Alteromonas</i> , <i>Shewanella</i> ...)
	Ordre XI : Vibrionales	famille des Vibrionaceae (avec les genres <i>Vibrio</i> , <i>Listonella</i> , <i>Photobacterium</i> ...)
	Ordre XII : Aeromonadales	famille des Aeromonadaceae (avec les genres <i>Aeromonas</i> ,...)
Ordre XIII : Enterobacterales	famille des Enterobacteriaceae (avec les genres classiques mais aussi <i>Plesiomonas</i> ...)	
Ordre XIII : Pasteurellales	famille des Pasteurellaceae (avec les genres <i>Pasteurella</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Actinobacillus</i> ...)	

2. POUVOIR PATHOGÈNE

- ***H. influenzae*** est un hôte fréquent de la muqueuse respiratoire. Il est un pathogène occasionnel (opportuniste) fréquent des voies respiratoires et parfois en cause dans les méningites. C'est surtout le **sérotype b capsulé** qui est en cause appartenant au biotype 1. Formule de la capsule : $-(\beta\text{DRibose}-(1\text{Ø}1)\text{-D-Ribitol-5-Phosphate})\text{-}$ ou PRP.
- ***Haemophilus parainfluenzae***, opportuniste, peut être en cause dans des infections respiratoires.
- ***Haemophilus ducreyii*** est responsable du chancre mou (chancre local et adénopathie correspondante), Maladie sexuellement transmissible (MST).

3. ISOLEMENT

L'isolement d'*Haemophilus* a nécessité la fabrication de nouveaux milieux. **Il cultive en effet très mal sur gélose au sang frais**. On lui préférera la **gélose au sang cuit** ou la **gélose chocolat supplémentée** (ou enrichie) : les colonies minuscules sur GS deviennent souvent luxuriantes sur gélose Chocolat enrichie.

La **gélose au sang cuit** est une gélose de base riche (Columbia), additionnée de 5 % de sang et chauffée 10 minutes à 75°C. La cuisson élimine certains inhibiteurs, en particulier la **NAD hydrolase du plasma et libère le NAD, le fer et l'hémine de l'hématie**.

On préfère la **gélose Chocolat enrichie** qui a une composition plus régulière. C'est une base type Columbia ou Mueller Hinton additionnée d'hémoglobine, base autoclavée. Elle est éventuellement supplémentée d'un mélange glucosé, ionisé et polyfacteurs de croissance lyophilisé et stérile, lorsqu'elle est en surfusion.

Ce mélange commercialisé (Polyvitex Mériex par ex.), souvent appelé mélange vitaminique alors qu'il contient du glucose et des ions minéraux, contient :

- Glucose
- Ions minéraux (nitrate de fer III)
- Acides aminés (glutamine, cystéine, cystine)
- Bases azotées (Adénine-Guanine)
- Coenzymes (PAB, NAD, TPP)

Une incubation sous dioxyde de carbone est parfois préférable.

Il peut être rendu sélectif par bacitracine (300 mg/L) ou vancomycine, bacitracine et clindamycine.

Il ne peut être observé d'hémolyse en gélose Chocolat supplémentée puisqu'il n'y a pas d'hématies. Un éclaircissement apparaît souvent avec les *Streptococcus* sous l'action possible de peroxydases ?

4. IDENTIFICATION

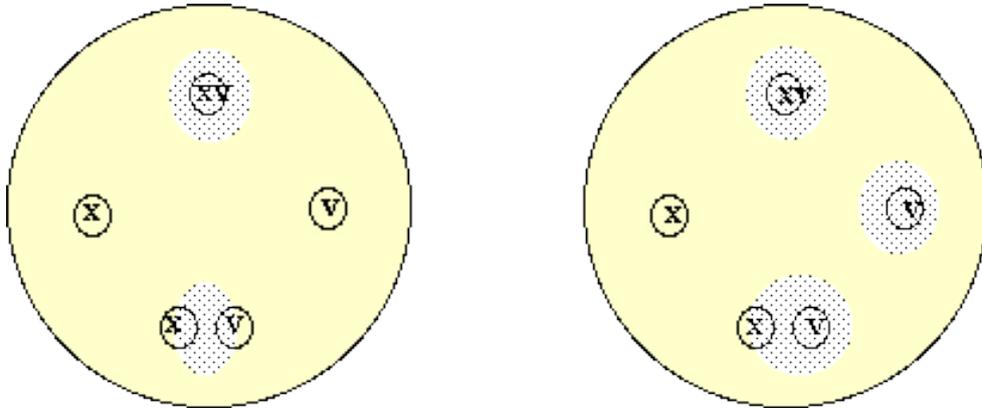
Elle repose sur la mise en évidence des besoins en facteurs NAD et hémine.

Deux grandes techniques permettent la mise en évidence :

- disques**: La culture est réalisée sur gélose ordinaire riche (Trypticase soja ou Columbia ou Mueller Hinton), inondée de la culture de l'Haemophilus puis des disques d'hémine et de NAD sont déposés. On compare les cultures autour des disques pour conclure.



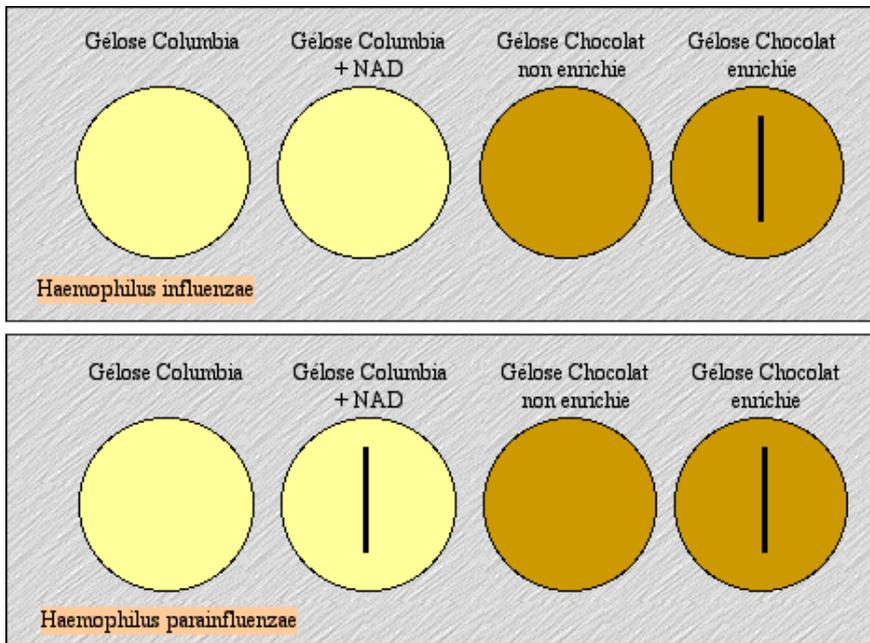
(disques commercialisés)



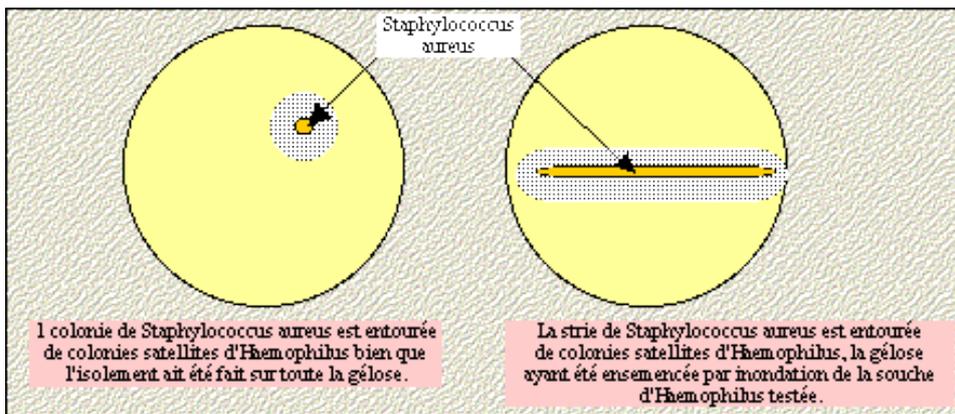
à gauche : besoin en X+V (Hémine + NAD) *H. influenzae* à droite : besoin en NAD (V) *H. parainfluenzae*

(Extrait du Dictionnaire des techniques du CRDP de Bordeaux)

- cultures comparées** en Chocolat, Chocolat supplémentée, Trypticase soja, Trypticase soja supplémenté. Le supplément utilisé peut être le Polyvitex. La gélose Chocolat contient évidemment l'hémine.



- Remarque : on peut aussi utiliser la culture en association avec une souche productrice de NAD dans le milieu comme *Staphylococcus aureus* ou *Enterococcus faecalis*. Ce constat peut aussi être fait lors de l'isolement. Comme pour les disques on observe la culture de *Haemophilus* autour des souches.



(Extrait du Dictionnaire des techniques du CRDP de Bordeaux)

Cette dernière technique peut être réalisée sur la Gélose Chocolat (SANS Polyvitex) : *Haemophilus influenzae* va alors cultiver autour de la strie et *Haemophilus parainfluenzae* de même.

La photographie ci-dessous le montre : remarquer le dégradé de culture au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la strie de *Staphylococcus*, donc la concentration en NAD.



L'identification précise utilise :

- théoriquement l'oxydase : elle s'avère le plus souvent négative (la littérature la donne positive) avec les souches utilisées dans les lycées provenant de l'Institut Pasteur... et positive avec des souches hospitalières !
- une galerie API20E ensemencée avec suspension en hémine et NAD.
- ou de préférence des galeries spécialisées, souvent communes avec les Neisseria, comme la galerie **API NH** (voir Documentation technique du CRDP de Bordeaux).

Notes sur la galerie API20NH :

Elle est prévue pour être lue en DEUX heures. Elle inclut :

- en lecture directe
 - un test chromogénique de recherche de bêtalactamase (bleu -, jaune et variations sur jaune : +).
 - l'étude de diverses utilisations de glucides (GLU, FRU, MAL, SAC)
 - ODC
 - Uréase
 - LIPase (incolore -, bleu +)
 - PAL (phosphatase alcaline) (incolore -, jaune +)
 - βGAL (BétaGalactosidase) (incolore -, jaune +)
- après addition de ZYM B dans les trois dernières cupules
 - dans la cupule LIP : ProA Proline aminopeptidase (jaune -, orange +; brun si LIP+)
 - dans la cupule PAL : GGT (Gammaglutamyl transférase) (jaune -, orange +; jaune-orange si PAL+)
 - dans la cupule βGAL : après addition d'un réactif de recherche de l'indole (James par exemple) Indole (incolore -, rose +)

5. TRAITEMENT ET ANTIBIOGRAMME

L'antibiogramme pose problème particulier au vu des exigences de culture. On doit utiliser une gélose supplémentée : Chocolat supplémentée ou MH additionné d'extrait globulaire ou des mélanges de facteurs de croissance (milieu HTM pour *Haemophilus* Test Medium, Mueller Hinton additionné de NAD, hémine et extrait de levure).

Les *Haemophilus* sont résistants aux lincosamines et peu sensibles aux macrolides.

Il existe des résistances et des multirésistances chez certaines souches (10 à 15 % des souches en France).

La **bétalactamase doit être recherchée et dès l'isolement car elle est constitutive** (par exemple test Cefinase®).

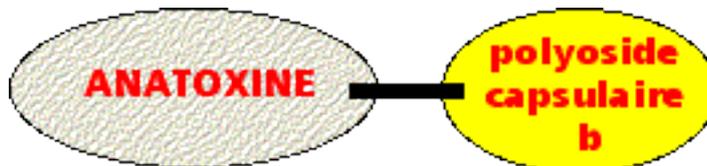


Antibiogramme d'*Haemophilus influenzae* sur gélose Chocolat supplémentée
Test Cefinase positif

Les antibiotiques utilisés sont normalement l'ampicilline et le chloramphénicol, mais la grande fréquence des résistances (40%) conduit à conseiller une céphalosporine de 3^{ème} génération (céfotaxime) dans le cas des méningites et de l'association de type Amoxicilline + Acide clavulanique pour les infections respiratoires.

6. PROPHYLAXIE

Elle repose essentiellement sur un [vaccin](#) contre **Haemophilus influenzae b**, constitué du polyside capsulaire lié à une protéine, généralement une anatoxine diphtérique ou tétanique. Cette association permet au bébé de fabriquer des anticorps en rendant immunogène le polyside qui, injecté seul, ne provoque pas de production d'Ac.



L'introduction de ce vaccin (France 1992) a provoqué une chute des méningites à *Haemophilus influenzae* que l'on peut mesurer par l'incidence chez les enfants de 0 à 1 an en France :

- 1992 : 33,6 pour 100 000
- 1996 : 2,2 pour 100 000

Ce texte a été écrit par Jean Noël Joffin, corrigé par Dominique Étienne, qui souhaite que vous lui transmettiez vos critiques. Merci.

COMPLÉMENTS

Un cas surprenant : Bactériémie à *Haemophilus influenzae* non sérotypable à point de départ génital chez une femme enceinte

P. Imbert (hiabegin.mit@woridaonline.tr), C. Rapp, J.M. Dot, T. Debord, R. Roué

Service des maladies infectieuses et tropicales, hôpital d'instruction des armées Bégin, 69, avenue de Paris, 94160 Saint-Mandé, France

(Médecine et maladies infectieuses 2001; 31 ; 723,724)

Les bactériémies à *Haemophilus influenzae* sont rares, représentant 0,1 à 1% des bactériémies de l'adulte [1]. Le point de départ en est le plus souvent pulmonaire ou ORL, en relation avec des souches encapsulées biotype I sérotype b. Dans 5 à 10 % des cas, elles sont d'origine gynéco-obstétricale en rapport avec des formes non capsulées pourtant réputées peu invasives. Nous en rapportons un nouveau cas chez une femme enceinte immunocompétente.

CAS CLINIQUE

Madame E.B., âgée de 29 ans, mère de deux enfants originaire du Cap-Vert, sans pathologie connue ni contraception, était admise le 11 mai 1999 pour des métrorragies fébriles avec frissons apparues la veille et précédées depuis six jours de brûlures mictionnelles, de pollakiurie et de lombalgies. À l'admission, l'examen clinique était normal en dehors d'une fièvre à 39°C et d'un état général altéré sans modification hémodynamique. L'échographie pelvienne révélait une grossesse monochoriale de 12 semaines. Les radiographies du thorax et des sinus étaient normales. Les examens biologiques montraient une leucocytose à 14 400/mm³ (13 000 neutrophiles) et une CRP à 107 mg/L. L'examen cyto bactériologique des urines était normal, mais le prélèvement vaginal et trois hémocultures révélaient la présence de *H. influenzae* biotype II non sérotypable sensible à l'amoxicilline (Centre National de Référence, Pr Dabernat). Les sérologies de la listériose et du VIH étaient négatives. Malgré le céfotaxime IV 3 g/j débuté dès l'admission, les métrorragies s'aggravaient jusqu'à l'expulsion du fœtus, motivant une révision utérine le 12 mai. Le liquide d'aspiration utérine s'avérait stérile, mais l'histologie du placenta confirmait l'existence d'une placentite. L'évolution ultérieure était rapidement favorable avec apyrexie dès le 13 mai, autorisant le 14 mai un relais par amoxicilline-acide clavulanique per os 3 g/j pendant 15 jours, et la sortie le 21 mai.

COMMENTAIRES

Classiquement les souches non capsulées sont responsables d'infections essentiellement locales, bronchopulmonaires et ORL surtout [1]. En fait les bactériémies à *H. influenzae* non capsulées de l'adulte sont devenues majoritaires depuis la raréfaction des infections à souches capsulées liée à la vaccination anti-*Haemophilus* [2], sans augmentation globale de l'incidence ou de la gravité de ces infections [2, 3]. Leur origine est surtout pulmonaire, puis ORL. Une immunodépression est alors fréquemment retrouvée [1, 3].

Une porte d'entrée gynéco-obstétricale est présente dans 5 à 10 % des cas [1]:

- **en dehors de la grossesse**, l'incidence annuelle des infections à *H. influenzae* non sérotypables, endométrites et/ou salpingites, est en augmentation. Le rôle favorisant d'un dispositif intra-utérin et des rapports bucco-génitaux est évoqué par certains auteurs [1]. La prédominance du biotype IV, soulignée par certains [4], est contestée par d'autres auteurs [5];
- **chez les femmes enceintes**, la prévalence de ces infections est six fois plus élevée que chez les femmes du même âge non gravides [1]. Les aspects cliniques et bactériologiques varient selon le stade de la grossesse [1, 4]: avortement fébrile en début de grossesse (biotype II ++), chorioamnionite près du terme, volontiers suivie d'une rupture prématurée des membranes (biotype IV ++), endométrite en post-partum surtout après une césarienne ou une rupture prématurée des membranes. Une colonisation génitale existe dans 1 à 2 % des grossesses seulement, mais elle entraîne une infection néonatale dans 50 % des cas même en l'absence de symptômes chez la mère [1, 5, 6]. Chez la femme enceinte, les bactériémies à *H. influenzae* ont une origine essentiellement génitale, sauf chez les toxicomanes [1, 4]. Elles surviennent surtout aux périodes extrêmes de la grossesse, et ont un pronostic sévère chez la mère [1] et surtout chez l'enfant: mort in utero, prématurité, infection néonatale [6, 7]. C'est pourquoi, en l'absence de consensus, le Collège national des gynécologues-obstétriciens français recommande la recherche d'un portage d'*H. Influenzae* au même titre que celui du streptocoque B ou d'*E. coli*, par la réalisation systématique d'un prélèvement vaginal chez toutes les femmes enceintes entre 35 et 37 semaines d'aménorrhée. En cas de présence d'*H. influenzae*, une antibiothérapie à visée éradicatrice est proposée par plusieurs auteurs [S-7]. Cependant cette attitude doit être validée par des études contrôlées.

Le traitement de ces bactériémies repose sur les céphalosporines de 3^{ème} génération ou sur l'association amoxicilline-acide clavulanique. En effet, si les souches non typables ont encore une sensibilité aux antibiotiques meilleure que celle des souches encapsulées, elles présentent néanmoins un phénotype sécréteur de β -lactamase en constante augmentation [1, 3].

CONCLUSION

Les infections gynéco-obstétricales à *Haemophilus influenzae* sont rares bien qu'en augmentation constante. Elles sont responsables chez la femme enceinte de bactériémies de pronostic maternofoetal redoutable. Un dépistage paraît justifié en cours de grossesse, suivi d'une éradication systématique en cas de colonisation par *H. influenzae*.

RÉFÉRENCES

- 1 Guérin JM, Verschoore-Beauchemin R. Infections à *Haemophilus influenzae* et apparentés chez l'adulte. Sem Hôp Paris 1997; 73: 101-13.
- 2 Dabernat H. *Haemophilus influenzae* (CNR). Bulletin épidémiologique annuel. Épidémiologie des maladies infectieuses en France. Situation en 1997 et tendances évolutives récentes. Réseau National de Santé publique, Saint Maurice, France, avril 1999, p. 57-61.
- 3 Perdue DG, Bulkow LR, Gellin BG, Davidson M, Petersen KM, Singleton RJ, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in Alaskan residents aged 10 years and older before and after infant vaccination programs. JAMA 2000; 283: 3089-94.
- 4 Quentin R, Musser JM, Mellouet M, Sizaret PY, Selander RK, Goudeau A. Typing of urogenital, maternal, and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in correlation with source of isolation and evidence for a genital specificity of *H. influenzae* biotype IV. J Clin Microb 1989; 27: 2286-94.
- 5 Schonheyder H, Ebbesen F, Grønnet N, Ejlersten T. Non-capsulated *Haemophilus influenzae* in the genital flora of pregnant and post-puerperal women. Scand J Dis 1991; 23: 1830-87.
- 6 Quentin R, Goudeau A, Burfin E, Pinon G, Berger C, Laugier J, Soutoul JH. Infections materno-foetales à *Haemophilus influenzae*. Presse Méd 1987; 16: 1181-4.
- 7 Rusin P, Adam RD, Petersen EA, Ryan K, Sinclair N, Weinstein L. *Haemophilus influenzae* : an important cause of maternal and neonatal infections. Obstet Gynecol 1991; 77: 92-6.