

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur

\*\*\*\*\*



\*\*\*\*\*

Université des Sciences des  
Techniques et des Technologies  
de Bamako

République du Mali  
Un Peuple-Un But-Une Foi

\*\*\*\*\*



\*\*\*\*\*

*Faculté de Pharmacie*

Année Universitaire 2017-2018

Thèse N°.....

**Surveillance de la résistance aux antibiotiques des  
bactéries pathogènes isolées des hémocultures au  
Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako**

*Thèse présentée et soutenue publiquement le 16/08/2018 à la Faculté de  
Pharmacie par :*

**Mme Fatoumata SANOGO**

*Pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie (DIPLOME D'ETAT)*

JURY

- Président du Jury** : Pr Flabou BOUGOUDOGO  
**Membre du Jury** : Dr Mohamed Ag BARAÏKA  
**Membre du Jury** : Dr Samba Adama SANGARE  
**Membre du jury** : Dr Oumar KASSOGUE  
**Co-directeur** : Dr Ibréhima GUINDO  
**Directeur de thèse** : Pr Souleymane DIALLO II

## SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	iv
LISTE DES ANNEXES .....	v
<u>LISTE DES PROFESSEURS</u> .....	vi
DEDICACES .....	xii
REMERCIEMENTS .....	xiii
LISTE DES ABREVIATIONS .....	xvii
I. INTRODUCTION .....	1
II. OBJECTIFS .....	3
III. GENERALITES .....	5
3. Généralités : .....	6
3.1. Définitions .....	6
3.2. Historique .....	6
3.3. Principe.....	7
3.4. Méthode d'hémoculture .....	8
3.5. Paramètres de l'hémoculture .....	8
3.6. Etude bactériologique : .....	14
3.7. Les principaux germes des hémocultures : .....	17
3.7.2. Cocci à Gram négatif : .....	22
3.7.3. Bacilles à Gram négatif : .....	22
3.7.4. Les bacilles à Gram positif : .....	25
3.8. La résistance bactérienne aux antibiotiques : .....	26
3.8.1. Résistance naturelle .....	26
3.8.2. Résistance acquise .....	26
3.8.3. Evolution/causes de la résistance .....	26
3.8.4. Support de la résistance .....	27
3.8.5. Mécanismes de la résistance : .....	27
IV. MATERIEL ET METHODES .....	28
4. Matériel et méthodes .....	29
4.1. Cadre d'étude .....	29
4.2. Type et période d'étude .....	30
4.3. Population d'étude.....	30
4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion .....	30
4.5. Echantillonnage .....	30
4.6. Variables étudiées .....	30

4.7. Collecte des données .....	30
4.8. Techniques de laboratoire .....	31
4.8.1. Hémo-culture .....	31
4.8.2. Méthodes d'identification des bactéries .....	37
4.8.3. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	41
4.9. Analyse des données .....	44
4.10. Aspects éthiques .....	44
V. RESULTATS .....	45
5. Résultats .....	46
5.1. Résultats globaux : .....	46
5.1.1. Distribution des patients selon leur provenance.....	46
5.1.2. Distribution des patients selon le sexe. ....	47
5.1.3. Distribution des patients selon la tranche d'âge. ....	47
5.2. Résultats descriptifs : .....	48
5.2.1. Distribution annuelle des hémocultures positives au LRM de janvier 2016 à décembre 2017. ....	48
5.2.2. Distribution des germes isolés des hémocultures.....	49
5.2.3. Evolution de la contamination des hémocultures selon le mois.....	50
5.2.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques .....	50
VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION .....	57
6. Commentaires et discussion .....	58
VII. CONCLUSION.....	61
VIII. RECOMMANDATIONS .....	62
Résumé .....	64
Abstract: .....	65
Références bibliographiques .....	66
ANNEXES .....	69

**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Protocole de prélèvement direct de flacons d'hémoculture.....	9
Figure 2 : Automate BacT/ALERT 3D (Source : LRM du CICM) .....	33
Figure 3: Bouillons de culture : à droite : FA, à gauche : FN .....	34
Figure 4: VITEK 2 compact.....	41
Figure 5 : Distribution des hémocultures en fonction de la tranche d'âge .....	47
Figure 6: Courbe d'évolution des contaminants d'hémoculture de janvier 2016 à décembre 2017 au LRM de Bamako. ....	50

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Répartition des hémocultures selon la provenance des patients .....	46
Tableau II : Répartition des hémocultures selon le sexe des patients. ....	47
Tableau III : Répartition annuelle des hémocultures au LRM. ....	48
Tableau IV : Répartition des germes isolés des hémocultures de janvier 2016 à déc. 2017....	49
Tableau V : Fréquence de la résistance aux Bétalactamines des entérobactéries isolées. ....	51
Tableau VI : Fréquence de la résistance aux Aminosides des entérobactéries isolées. ....	51
Tableau VII: Fréquence de la résistance aux Quinolones des entérobactéries isolées.....	52
Tableau VIII : Fréquence de la résistance aux Bétalactamines testés des BGN non fermentaires isolée des hémocultures .....	52
Tableau IX : Fréquence de la résistance aux Aminosides des BGN non fermentaires isolées.	53
Tableau X : Fréquence de la résistance aux Quinolones des BGN non fermentaire isolées....	53
Tableau XI : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des cocci à Gram positif isolés. ...	54
Tableau XII : Evolution de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries selon l'année. .....	55
Tableau XIII : Evolution de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaire. ....	55

**LISTE DES ANNEXES**

Annexe N°1 : Organigramme du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM.).....	69
Annexe N°2: Mode opératoire d'utilisation du Bact/ALERT 3D pour hémoculture .....	70
Annexe n°3: Mode opératoire de la technique de coloration de Gram .....	79
Annexe N°4: Mode opératoire de la recherche de la catalase.....	83
Annexe N°5: Mode opératoire du test de la coagulase .....	87
Annexe N°6: Mode opératoire du test à l'optochine.....	90
Annexe N°7: Mode opératoire de l'utilisation du vitek 2 compact.....	95

**FACULTE DE PHARMACIE****ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018****ADMINISTRATION**DOYEN : **M. Boubacar TRAORE** –PROFESSEURVICE-DOYEN : **M. Ababacar I .MAIGA**- PROFESSEURSECRETAIRE PRINCIPAL : **M. Seydou COULIBALY** – ADMINISTRATEUR CIVILAGENT COMPTABLE : **M. Famalé DIONSAN** – CONTROLEUR DES FINANCES**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Mahamadou	CISSE	Biologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
M. Boulkassoum	HAÏDARA	Législation
M. Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
M. Alou A.	KEÏTA	Galénique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie/Virologie
M. Abdourahamane S.	MAÏGA	Parasitologie
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie

**DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES****1. Professeurs/Directeurs de recherche**

M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
M. Alassane	DICKO	Santé Publique
M. Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
M. Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie

**2. Maîtres de conférences/Maitres de recherche**

Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
Akory Ag	IKANANE	Santé Publique/ Nutrition
Bourèma	KOURIBA	Immunologie Chef de DER
Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

### 3. Maîtres assistants/Chargés de recherche

M. Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie clinique
M. Seydina A. S.	DIAKITE	Immunologie
M. Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie clinique
Mme Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie moléculaire
M. Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbiologie
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie clinique
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie
M. Klétigui Casimir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Ibréhima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
Mme Aminatou	KONE	Biologie moléculaire
M. Birama Apho	LY	Santé publique
M. Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie cellulaire
M. Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique/ Biostatistiques
M. Issaka	SAGARA	Santé Publique/ Biostatistiques
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie
Mme. Fanta	SANGHO	Santé publique
M. Mahamadou S.	SISSOKO	Santé Publique/ Biostatistiques

### 4. Assistants/Attachés de recherche

M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique-Biologie végétale

Mme. Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
Mme. Fatou	DIAWARA	Épidémiologie
Mme. Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
M. Oumar	GUINDO	Épidémiologie
M. Falaye	KEÏTA	Santé Public/Santé Environnement
Mme. N'Deye Lallah Nina	KOÏTE	Nutrition
M. Yacouba	MAÏGA	Biostatistique
M. Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
M. Oumar	SANGHO	Épidémiologie
M. Djakaridia	TRAORE	Hématologie

### **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

#### **1. Professeurs/Directeurs de recherche**

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
M. Saibou	MAIGA	Législation
Mme. Rokia	SANOGO	Pharmacognosie Chef de DER

#### **2. Maîtres assistants/Chargés de recherche**

M. Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
M. Moussa	SANOGO	Gestion
M. Yaya	COULIBALY	Législation
Mme. Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Souleymane	DAMA	Sciences Pharmaceutiques
M. Hama Boubacar	MAÏGA	Galénique
M. Moussa	SANOGO	Gestion

#### **3. Assistants/Attachés de recherche**

M. Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie

M. Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAÏDARA	Pharmacognosie
Mme. Assitan	KALOGA	Législation
M. Ahmed	MAÏGA	Législation
Mme. Aïchata Ben Adam	MARIKO	Galénique
M. Aboubacar	SANGHO	Législation
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
M. Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
Mme. Aminata Tieba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
M. Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

## **DER: SCIENCES DU MEDICAMENT**

### **1. Professeurs/Directeurs de recherche**

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
M. Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
M. Ababacar I	MAIGA	Toxicologie

### **2. Maîtres de conférences/Maitres de recherche**

Sékou	BAH	Pharmacologie Chef de DER
-------	-----	---------------------------

### **3. Maîtres assistants/Chargés de recherche**

M. Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
M. Mody	CISSE	Pharmacie Chimique
M. Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

### **4. Assistants/Attachés de recherche**

M. Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
Mme. Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
M. Blaise	DACKOOU	Chimie Analytique
Mme. Fatoumata	DAOU	Pharmacologie

M. Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
M. Abdourahamane	DIARA	Toxicologie Bromatologie
M. Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
M. Madani	MARIKO	Chimie Analytique
M. Mohamed El béchir	NACO	Chimie Analytique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
M. Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. Professeurs/Directeurs de recherche**

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>CHEF de DER</b>
M. Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
M. Mahamadou	TRAORE	Génétique

### **2. Maîtres de conférences/Maitres de recherche**

M. Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
------------	---------	------------------

### **3. Assistants/Attachés de recherche**

M. Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
M. Modibo	DIALLO	Génétique
M. Moussa	KONE	Chimie Organique
M. Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

## **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

M. Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
M. Babou	BAH	Anatomie
M. Adourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
M. Souleymane	COULIBALY	Psychologie de la Santé
M. Bouba	DIARRA	Bactériologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition
M. Moussa I.	DIARRA	Biophysique
M. Babacar	DIOP	Chimie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie

M. Yaya	KANE	Galénique
M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
M. Almoustapha I	MAIGA	Virologie
M. Massambou	SACKO	SCMP/SIM
M. Modibo	SANGARE	Anglais
M. Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
Mme. Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
M. Fana	TANGARA	Maths
M. Abdel Kader	TRAORE	Sémiologie/Pathologies Médicales
M. Boubacar	ZIBEÏROU	Physique

## DEDICACES

Je dédie ce travail à :

- **Mon père Feu Balla SANOGO :**

Père exemplaire, humble et modeste. Cher Papa les mots me manquent pour exprimer l'affection que je te porte. Ton encouragement et ta rigueur dans l'éducation nous ont donné l'esprit du travail bien fait. Je me rappelle des découragements reçus quand j'ai choisi la pharmacie après le BAC mais tu as été la personne qui m'a encouragée et soutenue dans ce choix. J'ai toujours voulu partager cet instant solennel avec toi mais Le Tout Puissant a voulu ce cœur vibrant dans un temps sombre. Puisse ce travail te rendre heureux et fier de moi jusque dans ta dernière demeure. Que le très miséricordieux t'accepte dans son paradis firdaws. Amina !

- **Ma mère Kamba SAMAKE :**

Femme douce, généreuse et très bonne conseillère. Mère tu as toujours été un support sur lequel tes enfants se sont reposés dans chaque épreuve. Tes réprimandes, tes critiques et ta sagesse ont fait de nous tes enfants des exemples. Ton aide et ta bénédiction m'ont permis d'atteindre le bout de mon ambition. Qu'ALLAH nous offre une longue vie pour que tu puisses partager le fruit de ce travail avec nous.

- **Mes frères et sœurs :**

Abdoulaye, Mamadou, Hamidou, Fousseni, Issouf, Dalla, Mariam et Kadiatou. Vous m'avez toujours apporté vos soutiens et votre aide inconditionnelle durant toutes ces longues années d'étude. Recevez ici la reconnaissance de vos encouragements.

- **Ma fille Kamba OUATTARA :**

Merci d'avoir donné un sens à ma vie. Avec toi mes journées sont de plus en plus remplies de joie. Je te souhaite une longue vie pleine de santé et de succès. Que la bénédiction du Tout Puissant soit sur toi.

**REMERCIEMENTS :**

Tout d'abord, je tiens à remercier le bon **DIEU** pour m'avoir donné la santé, la chance et le courage d'effectuer ce travail et de pouvoir traverser les grandes difficultés rencontrées lors de toutes ces années d'études passées à la Faculté de Pharmacie.

Je tiens sincèrement à remercier et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes :

- Mon frère **Hamidou SANOGO**, Géotechnicien, pour ses orientations et appuis multiformes ;
- Mon mari **Daouda OUATTARA**, Pour son soutien et encouragement tout au long de ce travail.
- Tous mes frères, sœurs et proches familiales pour leurs amours fraternels et leurs soutiens ;
- Mes amis (es) particulièrement **Hawa KANSAYE, Alima TRAORE** en souvenir des moments agréables passés ensemble, veuillez recevoir l'expression de ma tendre affection et mes sentiments les plus respectueux avec mes vœux de succès, de bonheur et de bonne santé
- A tout le personnel du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) :

Particulièrement **Dr Timbiné Lassana, Dr SANGARE, Nana Kadidia KEITA, Issa SOUMARE et Judicaël OUEDRAGO** pour leur accueil sympathique et leurs coopérations professionnelles tout au long de ce stage;

- A tous mes camarades du Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) pour le souvenir du temps passé.
- A tous ceux que j'aurais omis et dont les prières ont conduits à la finalité de ce travail. Je profite de cette occasion pour vous adresser mes profondes gratitude.

## HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

### **A notre maître et président du jury : Professeur Flabou BOUGODOGO**

- ✓ Professeur agrégé de bactériologie et de virologie à la Faculté de pharmacie,
- ✓ Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la Faculté de pharmacie,
- ✓ Ancien Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé publique,
- ✓ Officier de l'ordre de mérite de la santé.

Cher maître, vous nous avez fait l'immense honneur de présider le jury de cet exercice de thèse, soyez-en remercié.

Enseignant de renommé international, vos Qualités scientifiques et humaines, ainsi que vos apports et suggestions ont sans aucun doute rehaussé grandement la qualité de ce travail

La richesse et la clarté de vos connaissances ainsi que votre disponibilité font de vous un maître apprécié et estimé par tous. Soyez rassuré, cher maître de notre disponibilité et de notre profonde gratitude.

### **A notre maître et juge : Docteur Mohamed Ag BARAÏKA**

- ✓ Pharmacien Microbiologiste
- ✓ Maître Assistant en bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie
- ✓ Enseignant Chercheur au centre de recherche et de lutte contre la drépanocytose

Cher maître, nous sommes très honorés de vous compter parmi le jury de ce travail.

Vos qualités intellectuelles, scientifiques et humaines ainsi que votre simplicité nous ont impressionnés tout au long de ce travail.

Veillez accepter cher maître, nos sentiments d'estime et de notre profond respect.

**A notre maître et juge : Docteur Samba Adama SANGARE**

- ✓ Pharmacien, Microbiologiste,
- ✓ PhD en Bactériologie-Virologie,
- ✓ Maître Assistant en Bactériologie-Virologie à la Faculté de Pharmacie.

Cher maître, nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté de juger ce travail.

Votre disponibilité et votre accueil nous ont permis d'apprécier vos qualités scientifiques et humaines.

Veillez agréer cher maître, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère admiration.

**A notre maître et juge : Docteur Oumar KASSOGUE**

- ✓ Pharmacien biologiste ;
- ✓ Chef de service du Laboratoire – Banque de sang de l'hôpital de Sikasso ;
- ✓ Chargé de recherche en biologie.

Cher maître, nous vous sommes très reconnaissants d'avoir accepté de juger ce travail.

Veillez accepter, l'expression de nos sincères remerciements et de notre profonde gratitude.

**A notre co-directeur : Docteur Ibréhima GUINDO**

- ✓ Pharmacien Microbiologiste,
- ✓ Chef de service de la bactériologie-virologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP),
- ✓ Maître Assistant en bactériologie-virologie à la Faculté de pharmacie.

Cher maître, vous nous avez fait un grand honneur en acceptant l'encadrement de ce document malgré vos multiples occupations.

Vos qualités en tant que directeur scientifique ont énormément rehaussé la valeur scientifique de cette thèse.

Puisse ce travail vous témoigner de nos sincères remerciements et notre profonde gratitude.

**A notre maître et directeur de thèse : Professeur Souleymane DIALLO II**

- ✓ Pharmacien biologiste,
- ✓ Professeur de Bactériologie et de virologie à la faculté de Pharmacie,
- ✓ Colonel Major à la retraite (services de santé des armées),
- ✓ Ancien Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Bamako.

Cher maître, nous vous remercions de nous avoir confié ce travail.

Votre rigueur scientifique, votre compétence ainsi que votre simplicité font de vous un enseignant reconnu et respecté de tous. Nous avons beaucoup appris à vos côtés, particulièrement la rigueur scientifique, l'esprit d'équipe et l'éthique. Nous nous engageons à rester fidèle à vos enseignements tout au long de notre vie.

Veillez trouver en ces quelques mots, le sentiment de notre profonde gratitude.

## LISTE DES ABREVIATIONS

<i>A. baumannii complex</i>	: <i>Acinetobacter baumannii complex</i>
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
<i>B. cepacia</i>	: <i>Burkholderia cepacia</i>
BGN	: Bacille Gram négatif
BGP	: Bacille Gram positif
BMR	: Bactéries multi résistantes
CICM	: Centre d'Infectiologie Charles Mérieux
CGPch	: Cocci Gram positif en chaînette
CGPgr	: Cocci Gram positif en grappe
CGPpr	: Cocci Gram positif en paire
CLIN	: Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
CO <sub>2</sub>	: Dioxyde de carbone
CoccoBGN	: Coccobacille Gram négatif
DGN	: Diplocoque Gram négatif
<i>E. cloacae</i>	: <i>Enterobacter cloacae</i>
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>H. influenzae</i>	: <i>Haemophilus influenzae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	: Lipopolysaccharide
LRM	: Laboratoire Rodolphe Mérieux
N <sub>2</sub>	: Diazote
Na Cl	: Chlorure de sodium
OMS	: Organisation mondiale de la santé
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
SARM	: <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
<i>S.aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SPS	: Poly anéthol sulfonate de sodium
<i>S. pyogenes</i>	: <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>S. pneumoniae</i>	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

# I. INTRODUCTION

## 1. Introduction :

Les hémocultures font parties des examens de diagnostics les plus fréquents en milieu hospitalier, elles sont déterminantes pour le diagnostic et la prise en charge de nombreuses bactériémies (1). Ces bactériémies constituent une préoccupation quotidienne pour le clinicien avec un taux de mortalité variant entre 4,5% et 50%. C'est une urgence diagnostique et thérapeutique, dont le diagnostic repose sur l'isolement et l'identification du pathogène (2, 3, 4).

Les bactéries responsables de septicémie ou de bactériémie sont très variables, et il faut parfois faire preuve d'ingéniosité pour pouvoir les isoler et les identifier. En Afrique l'hémoculture n'est pas toujours praticable dans bon nombre de structures sanitaires et le clinicien est contraint de suspecter la bactérie responsable afin de définir une attitude thérapeutique. En effet, rares sont les signes de certitude et le médecin raisonne plutôt par argument de fréquence (5).

La connaissance des principales espèces bactériennes responsables de bactériémies et le profil de sensibilité aux antibiotiques permettent de donner une base objective à l'antibiothérapie probabiliste des infections (6).

L'identification des bactéries à partir des hémocultures a eu un essor considérable avec les techniques actuelles et les tests de sensibilité aux antibiotiques permettent de corriger rapidement la prescription probabiliste (7). Cette antibiothérapie probabiliste reste nécessaire et doit être la plus efficace possible (8).

Cependant la prescription probabiliste des antibiotiques contribue au développement de la résistance, avec pour conséquences une durée d'hospitalisation prolongée, un surcroît financier et une exposition des patients à diverses complications.

Au Mali, Moudjongue OS avait retrouvée en 2014, 10,08% de bactéries multi-résistantes isolées des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux avec une prédominance des entérobactéries multi-résistantes (9). Ainsi Saye T, au laboratoire de biologie médicale du point G de 2006 à 2008, avait observé que les principaux phénotypes de résistance au bêtalactamines des entérobactéries étaient des Céphalosporinases (10).

Bien que la maîtrise de la diffusion des souches bactériennes multi résistantes aux antibiotiques est un problème de santé publique, considéré aujourd'hui comme une menace par l'organisation mondiale de la santé (OMS), il existe peu de données actualisées décrivant l'importance de ce phénomène au niveau du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako, d'où l'initiative de cette étude de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées des hémocultures.

## **II. OBJECTIFS**

## 2. Objectifs

### Objectif général :

Evaluer la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées des hémocultures au LRM de Bamako de janvier 2016 à décembre 2017.

### Objectifs spécifiques :

- Déterminer la fréquence des hémocultures positives au LRM durant la période d'étude;
- Déterminer le profil bactériologique des principales bactéries isolées des hémocultures au LRM durant la période de l'étude ;
- Etudier la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées des hémocultures au LRM durant la période d'étude.

### **III. GENERALITES**

### 3. Généralités :

#### 3.1. Définitions

L'hémoculture est une technique de laboratoire dont le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence de microorganismes pathogènes (bactéries ou levures) dans le sang circulant et d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques (11).

Elle consiste donc à mettre en culture un échantillon de sang afin d'identifier un ou plusieurs germes. La présence de germes dans une hémoculture signifie une bactériémie chez le patient ; lorsque celle-ci s'accompagne d'un syndrome infectieux, on parle de septicémie dont la forme la plus grave est le choc septique. L'hémoculture permet donc de poser le diagnostic d'une septicémie, d'identifier les différents germes responsables et de réaliser un antibiogramme afin d'orienter le médecin dans la prescription d'un traitement antibiotique efficace (12).

#### 3.2. Historique

Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, c'est l'étude d'une maladie particulière « le charbon » fréquente chez les moutons et le bétail, qui a permis d'établir que des « germes microscopiques » étaient la cause de la maladie (13).

En 1850, DAVAINÉ, un médecin Parisien fait un examen microscopique du sang d'un mouton mort de charbon, alors appelé « sang de rate » et observe des bâtonnets plus ou moins longs et flexueux. Mais la microbiologie n'étant pas encore née, DAVAINÉ ne rend pas ces infusoires responsables de la maladie (13).

En 1860, DELAFOND à Alfort trouve l'idée de mettre « en culture le sang en dehors de l'organisme ». A cet effet, il prélève du sang sur les animaux malades du charbon encore vivants et ainsi que sur les cadavres. Ce sang est « déposé dans les petits vases en verre à ouverture élargie et placée à l'air libre. Quatre jours après, les baguettes avaient augmentés du double et du triple de leur longueur » (13).

Le but qu'avait DELAFOND d'étudier les variations morphologiques des éléments microscopiques était atteint, bien qu'aucun milieu nutritif n'ait été utilisé à l'époque avec la notion d'hémoculture (13).

Il faut cependant attendre 1863 pour que DAVAINÉ affirme avec PASTEUR que les éléments microscopiques qu'ils ont nommé « bactéries » étaient responsables du charbon. Et dès 1865, le rôle que joue, la « culture du sang », apparaît dans les travaux de Louis PASTEUR (1822-1895). Il s'agit d'une part, de ses recherches sur la bactérie charbonneuse et d'autre part sur la « théorie des germes et ses application à la médecine et à la chirurgie » parues en 1878. PASTEUR met alors en évidence la virulence du germe cultivé en dehors de l'organisme, la stérilité du milieu sanguin dans les conditions normales et la possibilité de réaliser une culture pure in vitro des bactéries isolées d'un animal charbonneux (13).

Notons que L. COZE et V. FELTZ (professeurs à la Faculté de Médecine de Strasbourg) avaient dès 1866 relaté des faits similaires. Les recherches se poursuivirent sur les milieux de culture, les mieux appropriés ainsi que sur la méthode de prélèvement. La recherche d'un « bon milieu de culture » pour faire « se reproduire » le micro-organisme découvert dans le sang est donc un élément capital (13).

### 3.3. Principe

**Le diagnostic écologique d'une septicémie est assuré par l'hémoculture.**

Devant un tableau clinique de septicémie, 1 à 3 hémocultures sont pratiquées en quelques heures.

Le sang est un milieu stérile et la présence d'une bactérie quelle qu'elle soit est toujours anormale. L'hémoculture est un examen très performant. Il est sensible (on détecte, en théorie, une seule bactérie viable dans l'échantillon examinée) mais il faudra se souvenir qu'environ 15% des hémocultures positives ont été contaminées lors du prélèvement.

Au cours de la septicémie, le nombre de bactéries dans le sang est souvent très faible. Une quantité assez importante de sang doit donc être mise en culture si on veut avoir une chance qu'elle contienne au moins une bactérie.

Au cours des septicémies, la présence de bactéries dans le sang est **intermittente**. Il est donc nécessaire de :

- Réaliser plusieurs prélèvements ;
- Les prélever lors des épisodes bactériémiques (fièvres, frissons).

Le sang contient des facteurs limitant la croissance bactérienne (phagocytose, complément lysozyme, anticorps, parfois antibiotiques). Il est nécessaire de diminuer leur activité en diluant le prélèvement dans une grande quantité de milieu de culture (14).

### **3.4. Méthode d'hémoculture**

L'hémoculture a deux techniques : une technique de diagnostic, et une technique thérapeutique.

#### **3.4.1. Technique de diagnostic :**

Toute fièvre non expliquée doit faire l'objet de recherche d'un état septicémique ; que le tableau soit évocateur ou que la fièvre soit isolée. Une hypothermie majeure ; avec une température à 36, 5°C, doit faire rechercher un état septicémique.

#### **3.4.2. Technique thérapeutique :**

L'isolement et l'identification de la bactérie cliniquement significative, seront complétés par une étude de sa sensibilité à diverses substances antibactériennes pour un ajustement de l'antibiothérapie probabiliste préalablement insaturée par le clinicien, après ou avant le prélèvement sanguin, en fonction du tableau clinique du patient (14).

### **3.5. Paramètres de l'hémoculture**

Afin de diminuer le risque de faux positifs et d'identifier avec certitude la ou les bactéries incriminées, certains paramètres techniques sont à prendre en compte :

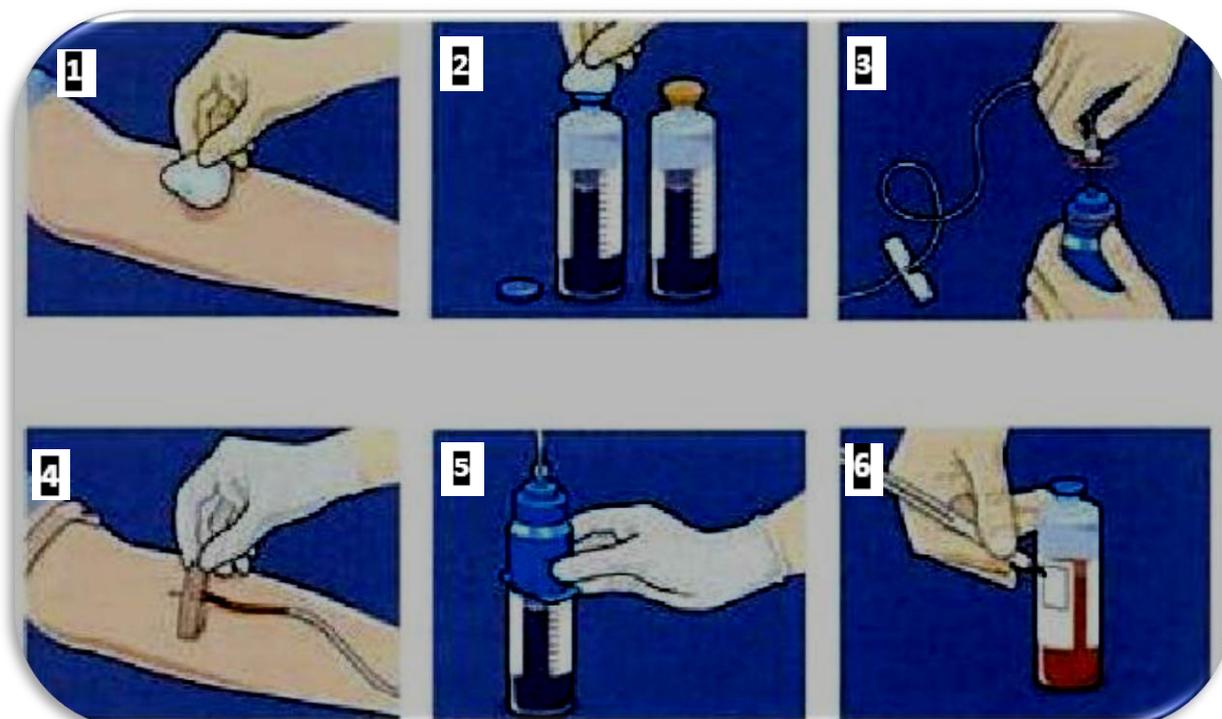
#### **3.5.1. Les paramètres pré-analytiques**

##### **3.5.1.1. Mode de prélèvement :**

Le prélèvement doit être réalisé après une asepsie rigoureuse. Toute contamination par des germes cutanés ou ambiants peut compromettre la culture de la bactérie recherchée et/ou gêner l'interprétation du résultat. De plus, tout prélèvement sanguin est associé à un risque non négligeable d'accident d'exposition au sang pour le préleveur. De ce fait pour tout établissement de santé, le protocole de prélèvement doit être strict et validé par le CLIN local (Comité de Lutte Contre les Infections Nosocomiales). Le port de gant est indispensable mais au préalable, le préleveur doit impérativement se laver les mains avec une solution hydro-alcoolique. L'asepsie de la peau du patient au point de ponction doit se faire de manière centrifuge successivement avec de l'alcool à 70° puis avec un produit iodé comme la polyvidone iodée. Après la ponction, le produit iodé, potentiellement irritant est enlevé avec de l'alcool à 70°. Le bouchon du flacon d'hémoculture est désinfecté soigneusement avec de

la polyvidone iodée ou de l'alcool à 70°. Le système de prélèvement est généralement constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille, l'une servant à pratiquer la ponction veineuse et l'autre l'inoculation du flacon grâce à un adaptateur. Le matériel de ponction est de plus en plus sécurisé pour limiter le risque d'accident d'exposition au sang. Le flacon aérobie est toujours ensemencé en premier, permettant ainsi d'évacuer l'air présent dans la tubulure avant d'inoculer le flacon anaérobie.

La ponction veineuse constitue la méthode de prélèvement habituelle des hémocultures, les autres sites de ponction, cathéters veineux ou artériels par exemple, augmentant la fréquence des contaminants. Cependant il faut bien garder à l'esprit que la peau possède une flore bactérienne où l'on retrouve principalement des staphylocoques et apparentés (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Micrococcus*, etc.) et des corynébactéries aérobie et anaérobie. Le nombre de bactéries cutanées est estimé entre  $10^2$  et  $10^5$  par  $\text{cm}^2$  d'où l'importance d'une asepsie rigoureuse avant le prélèvement pour éviter tout risque de contamination des flacons par ces germes (15).



1 = Asepsie de la peau ; 2 = désinfecter les bouchons des flacons ; 3 = relier l'adaptateur au dispositif du prélèvement ; 4 = pratiquer la ponction veineuse ; 5 = placer l'adaptateur sur le flacon en pressant le long du flacon ; 6 = étiqueter le flacon suivant la procédure habituelle.

**Figure 1 : Protocole de prélèvement direct de flacons d'hémoculture** (Source : bio Mérieux)

### 3.5.1.2. Le moment du prélèvement :

Pour éviter tout faux négatif, il est impératif de pratiquer le prélèvement le plutôt possible au cours de la maladie et surtout avant toute mise en route d'antibiothérapie. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique de 48 à 72 heures est recommandée. A l'exception des infections du système vasculaire où la bactériémie est continue, le moment du prélèvement est important car la bactériémie est discontinue ceux qui peut modifier la qualité du prélèvement. Les signes évocateurs sont très variés notamment en fonction du foyer initial, toutefois on peut retrouver :

- Des fièvres prolongées et inexplicables ou évoluant par pics, signant la présence de bactéries dans le sang ;
- Une hypothermie notamment pour les septicémies à cocci ou bacilles à gram négatif témoignant d'un état infectieux sévère ;
- La survenue de frissons, de marbrure ou de sueurs ;
- Une splénomégalie ;
- Une suspicion d'endocardite ;
- Tout signe traduisant un trouble de la coagulation sanguine, tel un purpura **(15)**.

### 3.5.1.3. Nombre et volume de prélèvement :

Deux à trois hémocultures par 24 heures, espacées de 30 à 60 minutes, sont généralement suffisantes pour isoler le germe responsable de la bactériémie. Un grand nombre de prélèvements exposant à une augmentation du risque de contamination, il est généralement conseillé de ne pas dépasser 4 hémocultures par 24 heures.

La densité bactérienne au cours de bactériémie est généralement faible chez l'adulte, de 1 à 10UFC/ml. Le recueil d'un volume suffisant de sang est donc nécessaire pour augmenter les chances d'isolement, mais un ratio sang-bouillon doit être respecté car une dilution au 1/10, voir au 1/5, permet d'inactiver l'effet bactéricide du sérum et de diluer les antibiotiques éventuels. Chez l'adulte, un volume de 10ml constitue donc un minimum et un doublement du volume (20ml) augmente de 30% la positivité des prélèvements. Chez le nourrisson et l'enfant, la densité bactérienne étant plus élevée (souvent supérieur à 1000UFC/ml), un volume de 1 à 2ml est suffisant **(15)**.

### 3.5.1.4. Le transport du prélèvement:

Les hémocultures doivent être acheminées le plus rapidement possible au laboratoire afin d'être introduites dans l'automate le plus tôt possible. Chaque hémoculture doit être étiquetée correctement et accompagnée d'une demande sur laquelle figurera : nom, prénom et date de naissance du patient ; le service d'origine ; la date, l'heure et mode de prélèvement (veineux direct ou sur cathéter ou autre dispositif) ainsi que la température du patient au moment où il est effectué sans oublier une éventuelle antibiothérapie et la nature de celle-ci (15).

### 3.5.2. Les paramètres analytiques :

Différents facteurs influent sur la positivité d'une hémoculture.

#### 3.5.2.1. Faible densité bactérienne:

Les bactéries sont le plus souvent en simple transit passif dans le sang. Le nombre de bactéries mis en culture, est alors faible et souvent de l'ordre de 1 bactérie /ml. Il est donc nécessaire d'ensemencer plusieurs ml de sang dans divers flacons et à plusieurs reprises pour majorer les chances de positivité d'une hémoculture.

Les répétitions de cultures permettent de :

- diminuer les chances de manquer une bactériémie transitoire.
- confirmer le rôle de pathogène d'isolements "saprophyte" tel que *Staphylococcus epidermidis*, si l'on les retrouve dans plusieurs prélèvements veineux.

Le volume de sang prélevé est la variable la plus importante. Plusieurs études révèlent une relation directe entre le volume de sang et le rendement de la technique. Le volume permet une augmentation significative du rendement technique :

- pour un prélèvement de 20mL à 40mL : +10% de positivité
- pour un prélèvement de 40mL à 60mL : +19% de positivité.

Une augmentation de volume entraîne une augmentation de la sensibilité (16).

#### 3.5.2.2. La vitalité bactérienne :

L'activation des différents mécanismes de défense de l'organisme, suite à une bactériémie, affecte la vitalité des corps bactériens captés lors du prélèvement. Plusieurs éventualités se présentent :

- Les corps bactériens sont intacts : ils sont soit libres dans le plasma en phase de multiplication ou bien ils correspondent à des bactéries au repos.
- Les corps bactériens lésés ou masqués du fait du système immunitaire ou l'effet des antibiotiques.
- Les corps bactériens sous forme « L » : correspondent à des bactéries déficientes nutritionnelles

La faible densité bactérienne, l'état lésé des corps bactériens, la phagocyte, expliquent que la mise en évidence de la positivité d'une hémoculture est très souvent retardée dans le temps par rapport à la rapidité d'obtention des cultures de repiquage au laboratoire (16).

### 3.5.2.3. Les milieux d'hémoculture

De très nombreux milieux présentés en flacon sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc, sont proposés par les fabricants. Pour favoriser la multiplication des corps bactériens en faible densité, captés lors du prélèvement il est nécessaire de procéder à une primo-culture.

- Choix du bouillon

Le bouillon pour hémoculture doit favoriser la croissance des bactéries cliniquement importantes.

Plusieurs bouillons sont utilisés :

- Bouillon cœur-cervelle ;
- Bouillon trypticase-soja ;
- Milieu au thioglycolate pour les anaérobies.

Un accent est mis sur la qualité de bouillon à ensemer. L'OMS (Organisation mondiale de la Santé) recommande de mélanger le sang avec dix fois son volume de bouillon soit pour 5mL de sang un équivalent de 50mL de bouillon (16).

### 3.5.2.4. Les facteurs de croissance

Certaines bactéries telles que les streptocoques défectifs responsables de certaines endocardites ont des besoins spécifiques pour leur croissance. Aussi, les bouillons doivent être enrichis d'additifs ; ces facteurs sont le plus souvent présents dans le sang du prélèvement.

Quel que soit le milieu, plusieurs additifs sont proposés.

- Atmosphère

La plupart des milieux commercialisés ont une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et en Azote (N<sub>2</sub>).

L'enrichissement en oxygène pour les germes aérobies se fait au moment du prélèvement.

- Anticoagulant

Outre son rôle d'inhibition de la coagulation sanguine, il vise aussi à neutraliser les effets antibactériens du sérum et des phagocytes.

Une concentration à 0,025% limite son effet inhibiteur sur la croissance des *Neisseria* et des *Peptostreptococcus*.

L'anticoagulant habituellement utilisé est le S.P. S. : Poly anéthol sulfonate de sodium.

D'autres anticoagulants tels que le citrate, l'héparine sont aussi utilisés.

- Saccharose

Une concentration de 10 à 15% de saccharose éviterait la lyse des bactéries à paroi déficiente. Son efficacité n'est cependant pas encore démontrée.

- Molécule à groupement « thiol » ou « pyridoxal »

Elles favorisent la croissance des bactéroïdes et de certains streptocoques déficients. Le groupement thiol neutralise un certain nombre d'antibiotiques, notamment les aminosides.

- Facteurs de croissance

L'hémine, la vitamine K3, favorisent le développement des bactéries exigeantes et anaérobies.

- Inhibiteurs d'antibactériens

La pénicillinase inactive les bétalactamines en occurrence aux pénicillines.

L'acide para-amino-benzoïque neutralise les sulfamides.

Si divers milieux sont proposés, leur composition est le plus souvent l'objet de protection industrielle.

- Flacon d'hémoculture

- Constitution des flacons :

De très nombreux milieux sont présentés par les fabricants en flacon sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc. Ils contiennent le bouillon nécessaire pour la primo-culture du prélèvement sanguin.

- Typologie des flacons :

Malgré la diversité des flacons sur le marché, deux types de flacons sont proposés au clinicien en pratique courante pour respecter le type respiratoire des microorganismes.

. Flacon aérobie grâce à leur atmosphère enrichie en oxygène, il favorise la croissance et la multiplication des bactéries aérobies strictes rencontrées en clinique. Le milieu de culture est mono ou biphasique.

. Flacon anaérobie : Ces flacons grâce au bouillon spécifique qu'ils renferment, favorisent la culture des bactéries anaérobies strictes.

. Flacons spéciaux : D'autres types de flacons sont proposés en fonction de la clinique du patient par les fabricants (16).

### 3.6. Etude bactériologique :

Dès réception au laboratoire les flacons doivent être incubés à 35-37°C et inspectés régulièrement. La durée d'observation varie entre 1 à 7 jours, lorsqu'il s'agit de la détection automatisée.

Devant une croissance définie par l'automate, le flacon est sorti, ouvert aseptiquement après désinfection de l'opercule de caoutchouc et une petite quantité de bouillon est prélevée à l'aide d'une anse stérile ou d'une aiguille stérile adaptée à l'usage, un frotti coloré par la méthode de Gram permet de repérer la présence des germes.

Le résultat de la coloration de Gram est communiqué au médecin prescripteur ainsi qu'il suit : Par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN (spécifier BGN semblables aux entérobactéries, BGN semblables à *Haemophilus* etc.), CoccoBGN, DCGN, Levures...

Un examen microscopique est complété par des repiquages sur milieux solides.

#### Repiquage et isolement – Identification

La réalisation des repiquages se fait en ensemençant en stries le contenu d'une anse ou d'une goutte de bouillon prélevée à l'aiguille, sur des milieux solides appropriés.

L'identification du germe se fera selon l'aspect des colonies sur des milieux différents de repiquage. A cet effet au laboratoire Rodolphe Mérieux les milieux utilisés pour la réalisation de subcultures à partir des flacons d'hémoculture sont :

- La gélose chocolat polyvitex ; (milieu enrichi sur lequel pratiquement toutes les bactéries poussent même les plus exigeantes) ;
- La gélose au sang frais (gélose COS) ;
- La gélose Drigalski (milieu sélectif pour les bacilles à Gram négatif) ;
- La gélose UriSelect (un milieu chromogène et colorimétrique sur laquelle toutes les bactéries se développent sous différentes colorations) ;

- La gélose Sabouraud (spécifique pour les levures et les champignons) ;
- La gélose Chapman (MSA) un milieu sélectif pour le staphylocoque ;

Dans les conditions où les risques de souillure sont élevés, il est possible de procéder à des subcultures à « l'aveugle ».

#### - **Détection automatisée :**

Divers automates (BACTEC 9050 chez Becton Dickinson, Bio Argos chez ORAPI GROUP, BacT/ALERT 3D chez bio Mérieux) permettent aujourd'hui de détecter l'hémoculture positive grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance des bactéries (CO<sub>2</sub>, ion H<sup>+</sup>, variation du potentiel redox du milieu). Ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats. La quantité des milieux utilisés permet l'isolement de bactéries autrefois rarement découvertes dans des hémocultures (*Haemophilus*, *Campylobacter*). Ces automates sont cependant onéreux et ne sont utilisés que par les laboratoires pratiquant un nombre important d'hémocultures (14).

#### **Résultats – Interprétation :**

Les résultats d'une hémoculture peuvent revêtir deux aspects :

##### - Les résultats normaux

Pour confirmer le diagnostic d'une septicémie, il faut s'assurer que toutes les conditions techniques ont été réunies, à savoir : milieux nutritifs stériles, absence d'antibiothérapie, prélèvements effectués au bon moment et de manière scrupuleuse, milieux de culture de qualité, atmosphère de CO<sub>2</sub>, condition d'aérobic et/ou anaérobic.

Par ailleurs, un résultat positif isolé peut être dû à une simple bactériémie physiologique ou encore la traduction d'une contamination exogène du prélèvement par les bactéries de la peau ou de l'air.

##### - Les résultats pathologiques

L'interprétation des résultats est parfois délicate et nécessite une étroite collaboration entre le clinicien et le microbiologiste.

Schématiquement, on peut distinguer trois types de résultats :

##### - **Premier cas**

Plusieurs hémocultures pratiquées chez un même patient sont positives et contiennent la même espèce bactérienne. L'interprétation est aisée, le diagnostic de bactériémie pathologique peut être posé et la bactérie considérée comme responsable même si elle n'est pas reconnue comme une bactérie pathogène opportuniste.

Cependant dans certain cas, en fonction de la porte d'entrée, l'hémoculture positive peut être poly microbienne chez un même sujet.

L'interprétation est plus difficile. La localisation du foyer infectieux permet de régler en général le problème. Ils sont surtout observés en cas de cathéters longtemps maintenus en place ou chez les patients immunodéprimés et très souvent chez les agonisants.

- **Deuxième cas**

Sur l'ensemble des hémocultures pratiquées chez un malade, une seule est positive. L'interprétation consistera ici à démontrer que le germe isolé provient ou non d'une contamination.

- S'il s'agit d'une bactérie pathogène spécifique (B.P.S), elle peut être considérée comme responsable.
- S'il s'agit au contraire d'une bactérie peu fréquemment retrouvée comme germe de souillure, en occurrence les Entérobactéries, les streptocoques, elle peut être considérée comme responsable surtout si le foyer infectieux est évocateur ou si le contexte clinique est en faveur de sa responsabilité.

- **Troisième cas**

Toutes les hémocultures réalisées sont négatives. Un tel résultat est un bon argument pour éliminer une septicémie, à condition bien sûr que les conditions de réalisation aient été scrupuleusement observées. Cependant, plusieurs hémocultures peuvent être négatives malgré une clinique évocatrice. Plusieurs causes d'échec peuvent expliquer l'obtention de faux négatifs : prélèvement effectué au mauvais moment ou tardivement, prélèvement fait sous antibiothérapie, quantité insuffisante de sangensemencé, milieux ou condition de culture inappropriées, temps d'observation trop court, mauvaise conservation des flacons, mauvais choix des conditions de subcultures.

Pratiquée avant toute antibiothérapie, et suivant un protocole rigoureux devant maintenir continuellement une asepsie totale, l'hémoculture constitue un élément capital du diagnostic d'une bactériémie physiologique ou pathologique. Les résultats de l'hémoculture en cas de positivité doivent cependant être par l'étude de l'activité de substances antibactériennes en vue d'une antibiothérapie en rapport avec la clinique du patient. La confirmation entre les résultats en laboratoire et la clinique s'avère donc indispensable à toutes les étapes du diagnostic (14, 17).

### 3.7. Les principaux germes des hémocultures :

Il convient tout d'abord de distinguer les bactériémies vraies des contaminations.

Si les bactériémies vraies sont le plus souvent mono microbiennes, une hémoculture positive poly microbienne (associée à certaines espèces) oriente plutôt vers une contamination du prélèvement. *Bacillus*, *Corynébactérium* et *Propionibacterium*, les bactéries de la flore cutanéomuqueuse, sont des contaminants dans plus de 95% des cas. Les Staphylocoques à coagulase négative (85% de contaminants), les entérocoques (20% de contaminants), et les streptocoques du groupe viridans sont responsables de bactériémies vraies : La discussion vrai/faux positive pourra se faire en répétant les hémocultures chez le malade et surtout en tenant compte de la clinique (18).

#### 3.7.1. Cocci Gram positif :

##### 3.7.1.1. Les streptocoques :

Le genre *Streptococcus* renferme quasiment toutes les espèces pathogènes de la famille des *Streptococaceae* comme *Streptococcus pyogenes* (groupe A), *Streptococcus agalactiae* (groupe B), *Streptococcus pneumoniae*.

La plupart des streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. La colonisation des muqueuses et des téguments par les Streptocoques est due à leur présence dans la flore normale, ils jouent un rôle important dans l'équilibre écobactériologique et dans l'acquisition de l'immunité naturelle non spécifique. Cette flore commensale (streptocoques oraux, Streptocoques des groupe B, C, D, G, L et *Streptococcus pneumoniae*) peut devenir pathogène dans certaines circonstances particulières et être responsable d'un grand nombre d'infections streptococciques sévères. Les Streptocoques du groupe A, bien qu'ils puissent se trouver à l'état latent sur la muqueuse pharyngée de nombreux porteurs sains, sont des bactéries très pathogènes chez l'homme (18).

L'hémolyse autour des colonies sur gélose à 5% de sang permet une première orientation diagnostique, ainsi on distingue :

- Les Streptocoques alpha-hémolytiques : l'hémolyse incomplète avec verdissement du milieu ;
- Les Streptocoques bêta-hémolytiques : l'hémolyse est complète avec éclaircissement de la gélose autour des colonies (3-4mm).

- Les Streptocoques non hémolytiques (19).

#### 3.7.1.1.1. *Streptococcus pyogenes* (groupe A) :

Le *S. pyogenes* est une bactérie strictement humaine, localisée au niveau des amygdales et du pharynx. Au microscope elle apparaît sous forme de cocci à Gram positif en chaînette avec la présence des polynucléaires.

Après 24-48 heures de culture les colonies des *Streptococcus* du groupe A ont un diamètre de 0,5 mm ; elles sont transparentes et translucides, en dôme (S) entourées d'une zone d'hémolyse type bêta. A noter que les streptocoques du groupe A peuvent donner des colonies minutes tout comme les streptocoques des groupes F, C et G.

##### ➤ Sensibilité aux antibiotiques :

Toutes les souches de streptocoques du groupe A sont sensibles à la Pénicilline G. La CMI est située entre 0,005mg/l et 0,02mg/l. La Pénicilline G est avec l'Amoxicilline l'antibiotique de choix pour la prophylaxie et le traitement des infections streptococciques du groupe A. Les macrolides et apparentés sont les antibiotiques à utiliser en cas d'allergie à la Pénicilline G. Les souches résistantes à ces antibiotiques sont exceptionnelles en France, alors que cette résistance est fréquente dans d'autres pays.

Les cyclines ont une activité variable selon les souches. Le pourcentage de streptocoques du groupe A résistant à ces antibiotiques est situé entre 20 et 30% (19).

#### 3.7.1.1.2. *Streptococcus agalactiae* (groupe B) :

Le streptocoque du groupe B est un commensal des voies respiratoires supérieures, des voies génito-urinaires et de l'intestin. Il est responsable d'infections graves chez l'adulte et le nourrisson.

Chez le nouveau-né, la méningite et l'ostéomyélite sont les infections les plus courantes. Au moment de l'accouchement 1 à 2% des enfants sont colonisés, soit au moment du travail (infection ascendante) soit lors de l'accouchement, mais seulement 1 enfant sur 10 fera une infection. Il peut présenter :

- Une forme précoce grave, survenant avant le 10<sup>ème</sup> jour de la vie avec détresse respiratoire, parfois septicémie et méningite ;
- Une forme tardive apparaissant après le 10<sup>ème</sup> jour, souvent méningée.

Après 24 à 48 heures les streptococoques du groupe B sont plus larges et sont en dôme, parfois pigmentées en jaune-orange en anaérobiose.

➤ Sensibilité aux antibiotiques :

Cette espèce est légèrement moins sensible à la pénicilline G. La CMI de 50% des souches se situe à 0,03g/l. Ces souches sont donc quand même accessibles à un traitement par les pénicillines.

Les macrolides et apparentés sont actifs dans la majorité des cas, mais environ 5% des souches sont résistantes à ces produits (19).

### 3.7.1.1.3. *Streptococcus pneumoniae* :

A l'examen microscopique, le pneumocoque apparaît formé de cocci Gram positif, souvent en diplocoques ovoïdes ou lancéolés opposés par leur pointe, formant un 8 et entourés par une large capsule. Parfois ils peuvent se présenter sous forme de courtes chainettes. La capsule est mieux visible après préparation à l'encre de Chine.

C'est une bactérie très fragile, sensible au froid et à la dessiccation et qui s'autolyse rapidement en culture aéro-anaérobie, sa culture sur milieux riches (gélose au sang) doit être faite à 37°C, sans délai après le prélèvement.

Sur gélose au sang, après 24 heures d'incubation, les colonies sont petites (goutte de rosée), entourées d'une zone d'hémolyse alpha, verdâtre. *Streptococcus pneumoniae* se différencie des autres Streptococoques par sa sensibilité à l'Optochine et par la lyse que produisent les sels biliaires sur culture en bouillon.

➤ Sensibilité aux antibiotiques

- Sensibilité diminuée aux bêta-lactamines

Les souches de *S. pneumoniae* sont naturellement sensibles aux bêta-lactamines, notamment à la pénicilline G et à l'Amoxicilline avec des CMI inférieure à 0,06mg/l. Néanmoins la proportion des souches de sensibilité intermédiaire (I) à la Pénicilline (CMI comprise entre 0,1 et 1mg/l) et celle des souches résistantes (R) à la Pénicilline (CMI supérieure à 1mg/l) ne cesse de croître.

La détection d'une souche résistante à la pénicilline doit conduire à la détermination de la CMI des autres bêta-lactamines car il existe des résistances croisées à des niveaux variables. Le Cefoxitine et l'Imipenème restent généralement actifs. Les souches résistantes appartiennent préférentiellement aux sérotypes 23F, 6, 19 et 14.

- Autres familles d'antibiotiques

Environ 50% des souches sont résistantes aux Macrolides mais restent sensibles aux Synergistines. Plus de 30% des souches résistent à la Tétracycline, 25% au Chloramphénicol et 40% aux Cotrimoxazole. Seuls les Glycopeptides sont constamment actifs.

Il existe une résistance naturelle aux Aminosides, à l'Acide fusidique, aux Polymyxines et à la plupart des Quinolones (14).

### 3.7.1.2. Le genre *Staphylococcus* :

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* qui regroupe les espèces bactériennes constituées de cellules arrondies (cocci) à Gram positif, immobiles, disposées en amas, à la façon d'une grappe de raisin.

Les Staphylocoques produisent une catalase, ce qui les distingue des Streptocoques et des Entérocoques. Ils sont aéro-anaérobies et poussent facilement sur milieu ordinaire.

- Classification :

L'opposition entre Staphylocoque doré pathogène et Staphylocoque blanc non pathogène est historique et insuffisante car elle ne répond pas à la réalité. On distingue aujourd'hui l'espèce *Staphylococcus aureus*, elle produit une coagulase (enzyme capable de coaguler le plasma de lapin oxalaté). Elle est très souvent responsable d'infections pyogènes graves. C'est aussi une espèce saprophyte ou commensale, isolée de prélèvements sur la peau ou les muqueuses ou sa présence est normale.

#### 3.7.1.2.1. *Staphylococcus aureus* :

Cette espèce est l'une des bactéries les plus souvent isolées au laboratoire de bactériologie médicale. Après culture de 24 heures sur gélose nutritive, *S. aureus* donne des colonies produisant en général un pigment doré. Il pousse et fermente le mannitol sur milieu de Chapman, faisant virer le rouge de phénol au jaune. Ce milieu contient une concentration de 7,5% de Na Cl qui inhibe la plupart des autres germes. Ce qui caractérise le mieux l'espèce *aureus* c'est la production d'une staphylo-coagulase, enzyme facile à mettre en évidence au laboratoire (20).

*Staphylococcus aureus* se présente sous forme de Cocci arrondis, immobiles, soit isolés, soit regroupés en courtes chainettes ou en amas dans le pus ou les éléments sont tantôt libres tantôt phagocytés (14).

Comme les autres Staphylocoques, *Staphylococcus aureus* est présent dans l'environnement (air, sol, aliments, mobilier et matériels). Il vit fréquemment à l'état commensal sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (21).

➤ Sensibilité aux antibiotiques :

- Les bêtalactamines :

La pénicilline G est très active sur les souches de *S. aureus* non productrices de pénicillinase, mais ces souches sont rares aujourd'hui (inférieur à 10%). Les souches productrices d'une pénicillinase redeviennent sensibles à l'Amoxicilline en présence d'acide clavulanique. Les Pénicillines semi-synthétiques du groupe M (méthicilline et oxacilline) ne sont pas détruites par la pénicillinase de *S. aureus*. Ce sont d'excellents antibiotiques anti-staphylococciques. De 10 à 50% des souches de *S. aureus* isolées dans les hôpitaux français résistent à la Méthicilline et à la l'oxacilline. Ce pourcentage varie selon les services. Ces souches sont désignées comme *Staphylocoques aureus* Résistant à la Méthicilline (SARM) ou encore comme souches (**méthi R**). Cette résistance est aussi qualifiée d' « homogène ». En effet, pour certaines souches, seulement une partie de la population bactérienne est capable *in vitro*, dans les conditions techniques précises, d'exprimer sa résistance. Les travaux cliniques ont montré que **toutes les Pénicillines et toutes les Céphalosporines sont actives sur les souches Résistantes à la méthicilline.**

- Les Glycopeptides :

La Vancomycine et la Téricoplanine sont des antibiotiques de recours pour traiter les septicémies et les endocardites dues à des souches de *S. aureus* multi résistantes. Leurs indications sont limitées aux infections mettant en jeu le pronostic vital et pour lesquelles aucune autre antibiothérapie n'est efficace. L'émergence de mutants résistants au cours de monothérapies par la Vancomycine a été signalée depuis 1997.

Ces souches de moindre sensibilité aux Glycopeptides sont désignées comme GISA : Glycopeptides Intermediate *Staphylococcus aureus*.

- Les autres familles d'antibiotiques :

Les souches résistantes à la Méthicilline sont habituellement résistantes à de nombreux autres antibiotiques, notamment aux Aminosides et aux Fluoroquinolones. Parmi les Macrolides l'Erythromycine a une activité inconstante. Le traitement des infections graves à *S. aureus* ne

peut se faire sans une étude approfondie au laboratoire de la sensibilité de la souche, en réserve à l'usage local. Elle est principalement utilisée pour éradiquer le portage nasal de *S. aureus* (14).

### 3.7.1.2.2. Les autres Staphylocoques :

Les Staphylocoques autres que *Staphylococcus aureus* sont souvent identifiés aux espèces non productrices de coagulase et sont connus comme "Staphylocoques à coagulase négative" (SCN). Leur identification se faisant par opposition à *Staphylococcus aureus*, d'où le terme de "*Staphylococcus non aureus*" (SNA) serait cependant préférable. Ce sont les principaux commensaux de la peau mais ils sont également isolés des muqueuses. La densité de colonisation est plus importante au niveau des régions situées à proximité des orifices ou les zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux (19).

### 3.7.2. Cocci à Gram négatif :

- Généralités sur les *Neisseriaceae* :

*Neisseria meningitidis* ou méningocoque est un diplocoque à Gram négatif intracellulaire en majorité en forme de grain de café mesurant 0,8µm à 1µm de diamètre, il est responsable de la méningite cérébro-spinale épidémique. Le méningocoque appartient à la famille des *Neisseriaceae* qui comprend actuellement deux genres d'intérêt médical :

-Le genre *Neisseria*

-Le genre *Kingella* (22).

### 3.7.3. Bacilles à Gram négatif :

Les bactéries à Gram négatif sont mises en évidence par une technique de coloration de Gram. Les bactéries à gram négatif apparaissent alors roses au microscope. Les techniques de coloration reposent sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie. La coloration de Gram est un facteur déterminant dans la taxonomie bactérienne.

Les bactéries à Gram négatif ont une structure qui s'organise en trois grandes parties, soit, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La membrane externe,
- L'espace périplasmique, comportant notamment la paroi,

○ La membrane plasmique.

La membrane externe est en contact direct avec le milieu externe. Elle est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche (partie hydrophile à l'extérieur et partie lipophile à l'intérieur) mais contient aussi de nombreuses protéines intrinsèques, notamment les protéines de transport appelées porines. Beaucoup de bactéries Gram négatif (par exemple *Salmonella*) possèdent aussi un composé non protéique appelé lipopolysaccharide ou LPS ; ce composé peu immunogène, dont le pouvoir pathogène (lipide A) est inclus dans la membrane externe, s'active lors de la lyse de la bactérie. La membrane externe est reliée au peptidoglycane par la lipoprotéine de Braun.

L'espace périplasmique est un espace de stockage d'enzymes, de nutriment... Il a beaucoup d'autres fonctions, notamment dans certaines étapes de la synthèse des protéines et dans le métabolisme. Il se situe entre la membrane externe et la membrane plasmique et contient une couche de peptidoglycane. La couche de peptidoglycane (aussi appelée muréine) est relativement mince chez les Gram négatif contrairement aux Gram positif.

La membrane plasmique est semblable à la membrane externe (excepté le LPS). Elle possède des protéines poreuses aboutissant dans l'espace périplasmique (la synthèse des protéines). La membrane plasmique contient de nombreux autres complexes protéiques d'une importance vitale pour la bactérie (comme l'ATP synthétase) qui ont des rôles prépondérants dans le métabolisme bactérien (22).

### 3.7.3.1. Les Enterobacteriaceae :

Les Enterobacteriaceae ou entérobactéries sont une vaste famille de bactéries qui sont rencontrées tous les jours en bactériologie médicale. Elles sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes, soit normaux, soit pathogènes, du tube digestif de l'homme et des animaux.

En fait la famille des Enterobacteriaceae est définie par des caractères bactériologiques et non par des caractères écologiques. Les Enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif qui :

- s'ils sont mobiles, sont péritriches (cils disposés tout autour du corps bactérien) ;
- poussent sur milieux ordinaires ;
- poussent en aérobiose et en anaérobiose ;
- réduisent les nitrates en nitrites ;
- ont une réaction d'oxydase négative ;
- utilisent le glucose par voie fermentative.

Cette définition permet d'exclure de la famille des Enterobacteriaceae d'autres bacilles à Gram négatif, par exemple les *Pseudomonas*, les *Acinetobacter*, les *Vibrio* et les *Aeromonas*.

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie.

Ce sont :

-*Escherichia*, *Shigella*.

-*Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*.

-*Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.

-*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (groupe KES « VP+ »), *Hafnia*.

-*Yersinia*, *Edwardsiella*.

D'autres genres plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme.

Ce sont :

*Buttiauxella*, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Obesumbacterium*, *Rhanella*, *Tatumella*, *Trabulsiella*, *Xenorhabdus*, *Yokenella*.

L'identification des Entérobactéries se fait d'abord par l'étude des caractères biochimiques. Mais au sein d'une même espèce, la variabilité de certains caractères permet de différencier les souches entre elles et de déterminer des biotypes.

L'étude des différents antigènes, qui intervient après celle des caractères biochimiques, permet de classer en stéréotypes les souches appartenant à une même espèce ou à un même genre. La détermination des sérotypes a un grand intérêt épidémiologique pour certaines Entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (14).

### 3.7.3.2. Les autres Bacilles Gram négatif :

#### 3.7.3.2.1. *Haemophilus influenzae* type b :

C'est un bacille à Gram négatif immobile de petite taille (0,5 – 2,5µm), agent supposé de la grippe (influenza) reçoit le nom générique d'*Haemophilus* car il exige pour sa croissance des milieux enrichis au sang et une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> « *Haemophilus influenzae* type b » est un hôte exclusif des muqueuses de l'homme principalement au niveau des voies aériennes supérieures (23).

➤ Sensibilité aux antibiotiques :

Jusqu'en 1974, l'ampicilline était le traitement de choix des méningites à *H. influenzae*. Depuis cette date on connaît des souches hébergeant un plasmide codant pour une **bétalactamase** qui hydrolyse la pénicilline G et l'ampicilline, mais qui est inactive sur les Céphalosporines. Cette production de bétalactamase concerne 15 à 25% des souches non capsulées, isolées en pathologie respiratoire chez l'adulte. Cette situation fait utiliser d'emblée une **Céphalosporine de troisième génération** pour traiter les infections invasives. La résistance des souches varie en fonction de la nature du prélèvement, elle concerne pour la tétracycline 10% des souches, le chloramphénicol 3%, la Kanamycine 25% et le Cotrimoxazole 10%. Toutes les souches sont sensibles aux Fluoroquinolones (14).

### 3.7.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* :

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est commensale du tube digestif, mais peu abondant chez le sujet sain, occasionne de nombreuses infections chez le sujet fragilisé. *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche (22).

➤ Sensibilité aux antibiotiques :

*P. aeruginosa* est une bactérie généralement **multi-résistante**.

Les antibiotiques pouvant avoir une bonne activité sont : la Ticarcilline, la Pipéracilline, l'Azlocilline, la Ceftazidime ; la Cefsulodine, le Céfépime, l'Imipénème et les Aminosides. Les souches résistantes à la Colistine sont très rares. La Ciprofloxacine est la plus active des Quinolones. L'activité de tous ces antibiotiques n'est pas régulière et doit toujours être précisée par antibiogramme (14).

### 3.7.4. Les bacilles à Gram positif :

Les bacilles dits "Gram positif" sont des bacilles répondant positivement au test de Gram. Le test de Gram vise à déterminer la nature des bactéries en cause et non la gravité de l'infection. Une infection par un bacille à Gram positif n'est en soi ni plus grave ni moins grave qu'une infection par des bacilles à Gram négatif. Le test de Gram permet d'ajuster les traitements antibiotiques. Il existe plusieurs types principaux de bacilles à Gram positif, entre autre nous pouvons citer : *Listeria monocytogenes* (provoquant la listériose) et *Corynebacterium spp.*

**3.7.4.1. *Listeria monocytogenes* :**

Ce sont des petits bacilles ubiquitaires, que l'on retrouve dans le sol, sur les plantes et dans les eaux (saprophytes). *L. monocytogenes* est une bactérie opportuniste responsable par diffusion hématogène de trois types d'infections chez l'homme :

- Listériose de l'adulte et de l'enfant : méningites, méningo-encéphalites, encéphalites, septicémie. La grande majorité de ces infections se produisent chez des malades porteurs de tares viscérales (cirrhose, cancers, etc...). La listériose de l'adulte atteint essentiellement les personnes âgées et immunodéprimées.
- Listériose de la femme enceinte : infection bénigne pour la femme, se traduisant souvent par une simple fièvre mais grave pour le fœtus, pouvant provoquer un avortement, la mort in utero ou l'accouchement prématuré.
- Listériose néonatale : septicémie, méningite secondaires à la contamination dans les jours qui précèdent l'accouchement ou au moment de l'accouchement (24).

**3.8. La résistance bactérienne aux antibiotiques :**

La résistance bactérienne est supportée par deux mécanismes distincts : les mutations génétiques de novo et les transferts d'éléments génétiques mobiles (14).

**3.8.1. Résistance naturelle :**

Certaines souches sont naturellement résistante à certains antibiotiques (exemple : les *Listeria monocytogenes* ou les entérocoques sont résistants aux Céphalosporines de troisième génération, les anaérobies aux Aminoglycosides, les bacilles à Gram négatif aux Glycopeptides...).

**3.8.2. Résistance acquise :**

Les souches qui en condition naturelle (= sauvages) sont sensibles à l'antibiotique mais qui ont acquis des mécanismes de résistances à cet antibiotique (exemple : *Streptococcus pneumoniae* résistant aux Pénicillines ou aux Macrolides, les Entérobactéries aux Bêta-lactamines, *Staphylococcus aureus* aux Pénicillines...).

**3.8.3. Evolution/causes de la résistance :**

Elle dépend : de la pression de sélection exercée par les antibiotiques des caractéristiques des différents antibiotiques (pharmacocinétiques, pharmacodynamiques) et chaque couple antibiotique/bactérie (support, modalité et fréquence de la résistance) de la capacité de certaines espèces à accepter des gènes de résistance provenant d'autres espèces, favorisée de

plus par les colonisations/infections plurimicrobiennes au sein d'un même site/hôte de la possibilité de transmission interhumaine. La sélection de bactéries résistantes est un effet inéluctable de l'utilisation des antibiotiques, sélection in vivo de bactéries résistantes sous traitement antibiotique dans le foyer infectieux, modification des flores commensales avec acquisition de bactérie résistantes en dehors du foyer infectieux. D'où l'importance d'une politique de « bon usage des antibiotiques », acte thérapeutique concluant une procédure diagnostique par un clinicien, ayant pour but la guérison d'une infection tout en ayant une efficacité optimale, une bonne tolérance, des conséquences écologiques minimales et un coût acceptable par la société (14).

#### **3.8.4. Support de la résistance :**

**3.8.4.1. Chromosomique :** liée à une mutation sur le chromosome bactérien ne s'exerce que vis-à-vis d'un seul antibiotique en générale non transférable d'une espèce bactérienne à l'autre concerne surtout les Quinolones, les Rifamycines, la Fosfomycine, l'Acide fusidique avec un taux de mutation élevé.

**3.8.4.2. Extra-chromosomique :** le plus fréquent le, plus souvent plasmique pouvant porter plusieurs résistances à la fois transmissible entre différentes bactéries de la même espèce, voire espèces différentes.

#### **3.8.5. Mécanismes de la résistance :**

Dépendent de :

- inactivation enzymatique de l'antibiotique (exemple : pénicillinases) ;
- modification de la cible (exemple : modification de la protéine de liaison aux pénicillines pour *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) ;
- diminution de la perméabilité membranaire ;
- augmentation des mécanismes d'efflux (14).

## **IV. MATERIEL ET METHODES**

## 4. Matériel et méthodes:

### 4.1. Cadre d'étude :

Le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) du centre d'infectiologie Charles Mérieux (CICM) a constitué notre cadre d'étude. Le CICM est situé dans le quartier de l'ex base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux.

Fruit de collaboration entre le Gouvernement de la république du Mali et la Fondation Mérieux, CICM a été mis en place suite à la signature de l'accord- cadre N° 0956/1989 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la convention du 16 janvier 2005 et son protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère de la santé et la Fondation Mérieux.

- ✓ 8 décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali ;
- ✓ 15 janvier 2004 : pose de la première pierre du CICM ;
- ✓ 17 janvier 2005 : Inauguration du CICM
- ✓ 2 mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM comprend :

- ✓ Une administration générale ;
- ✓ Un centre de formation pour des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage ;
- ✓ Un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de routines.

Le CICM a pour mission de participer tout comme les autres structures du Ministère de la santé au développement sanitaire du Mali par le service rendu aux malades, la formation, la recherche et le renforcement de capacité dans le domaine du diagnostic biologique dans les conditions désintéressées au bénéfice de la population.

Les ressources humaines du CICM sont composées de 28 agents (voire organigramme en annexe N°1) répartis entre les services techniques du LRM (18 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (10 agents).

Le laboratoire Rodolphe Mérieux se compose de deux laboratoires (1 et 2) au sein desquels les activités de recherches et de diagnostic de routine sont effectuées. Le laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et

d'immunologie et le laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie).

#### **4.2. Type et période d'étude :**

Il s'agit d'une étude rétro-prospective qui s'est déroulée au LRM de janvier 2016 à décembre 2017.

#### **4.3. Population d'étude :**

Notre étude a portée sur les résultats des demandes d'hémoculture des patients ambulatoires ou hospitalisés adressés au LRM du CICM.

#### **4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion :**

##### **4.4.1. Critère d'inclusion :**

Toutes les demandes d'hémoculture adressées au LRM de janvier 2016 à décembre 2017 associés ou non à un antibiogramme.

##### **4.4.2. Critère de non inclusion :**

Toutes les autres demandes d'analyse autres que l'hémoculture.

#### **4.5. Echantillonnage :**

Nous avons réalisés une étude rétro-prospective sur 359 demandes d'hémoculture adressés au LRM de janvier 2016 à décembre 2017.

#### **4.6. Variables étudiées :**

- Age des patients ;
- Sexe des patients ;
- Provenance de la demande d'hémoculture ;
- Espèces bactériennes isolées ;
- Sensibilité aux antibiotiques.

#### **4.7. Collecte des données :**

Les données ont été extraites du logiciel SYSLAM (CODATEC informatic, France). Le système CODAT informatique est un progiciel de gestion et de management de laboratoire,

dans le cadre de l'accréditation ISO 15189. Le CODAT intègre la gestion du contrôle de qualité en partenariat avec la société MELOS.

#### 4.8. Techniques de laboratoire :

##### 4.8.1. Hémoculture :

- **Réception des prélèvements :**

Les prélèvements reçus au laboratoire sont tout d'abord saisis sur support informatique au niveau de la réception. Ils sont ensuite acheminés au laboratoire, où ils sont inscrits dans un registre de laboratoire.

Le registre comprend :

- Une partie des renseignements sur le patient (numéro de laboratoire, nom et prénom, âge, sexe, résidence, origine...);
- Type de flacons utilisés (Flacon aérobie, Flacon anaérobie, Flacon pédiatrique);
- Résultat de la coloration de Gram;
- Nom(s) des germes isolés;
- Type de carte utilisée pour l'antibiogramme;
- Observation du biologiste.

- **Introduction des flacons dans l'automate :**

Après réception des flacons au niveau de la paillasse de bactériologie et enregistrement dans le registre, ils sont immédiatement acheminés et introduits dans l'automate (BacT/ALERT 3D de chez Bio Mérieux).

Tout flacon pour lequel l'on n'observe pas de croissance de la courbe bactérienne est déclaré négatif au bout de 7 jours d'incubation. Il est signalé par la présence du chiffre 1 dans la case qui porte le **signe moins (-)**.

Alors que tout flacon pour lequel une croissance bactérienne est détectée par l'automate est déclaré positif. Il est signalé par la présence du chiffre 1 dans la case qui porte le **signe plus (+)**.

##### 4.8.1.1. Présentation des méthodes :

- **L'appareil BacT/ALERT 3D :**

Le système « BacT/ALERT 3D Combination » fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bio Mérieux, la croissance des microorganismes dans chaque

flacon est constamment surveillée par un réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le BACTEC (25).

L'appareil « BacT/ALERT 3D Combination de chez bio Mérieux » tout comme l'appareil « BACTEC 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md », utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO<sub>2</sub>. Les microorganismes présents dans les bouteilles BACTEC libèrent du CO<sub>2</sub> qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui, est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO<sub>2</sub> libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités préprogrammés (26).

Un volume de 5mL de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans les flacons d'hémoculture qui sont saisis dès que possible dans l'appareil pour garantir son efficacité. Il s'agit d'une innovation par rapport à l'hémoculture classique qui demande un volume de 10mL de sang.

La capacité de l'automate « BacT/ALERT 3D Combination » est de 120 flacons et celle de « BACTEC 9050 » est de 50 flacons. Chez chacun de ces fabricants il existe d'autres automates de grande capacité.

Le BACTEC 9050 fonctionne par un système d'agitation continue des flacons versus intermittent des BACTEC des séries de grande capacité (BACTEC 9120 et BACTEC 9240) (18).



**Figure 2 :** Automate BacT/ALERT 3D (Source : LRM du CICM)

- **Les bouillons de cultures :**

Plusieurs types de flacons existent pour l'usage de l'automate BacT/ALERT 3D. Chacun d'entre eux a une composition précise :

- BacT/ALERT iFA (aérobies) : contient 30 ml de bouillon complexe supplémenté et du charbon activé. Réf. 251062
- BacT/ALERT iFN (anaérobie) : contient 40 ml de bouillon complexe supplémenté sous atmosphère  $N_2$  et  $CO_2$  et du charbon activé. Réf. 251063
- BacT/ALERT iFA PLUS (aérobie) : contient 30 ml de bouillon complexe supplémenté et billes polymériques absorbantes. Réf. 412990
- BacT/ALERT iFN PLUS (anaérobie) : contient 40 ml de bouillon complexe supplémenté sous atmosphère  $N_2$  et  $CO_2$  billes polymériques absorbantes. Réf. 412991



**Figure 3: Bouillons de culture : à droite : Flacon aérobie, à gauche : Flacon anaérobie**  
(source : LRM du CICM)

#### 4.8.1.2. Protocoles techniques des hémocultures :

##### 4.8.1.2.1. Hémocultures négatives :

Au bout de 7 jours d'incubation, si aucune croissance bactérienne n'est signalée, retirer le flacon de l'automate selon la procédure établie. (Voir annexe N°2)

Noter dans le registre la date de sortie et conclure que la culture est négative, rendre le résultat final comme étant négatif.

##### 4.8.1.2.2. Hémocultures positives :

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le BacT/ALERT 3D indique que l'hémoculture est positive qui se manifeste par l'apparition d'un signal coloré en jaune à l'écran du BacT/ALERT 3D:

1. Retiré de l'appareil BacT/ALERT 3D, la capsule en plastique du flacon est désinfecté avec de l'alcool, ensuite on insère une aiguille de subculture à travers la capsule et prépare immédiatement après une lame pour la coloration de Gram (voir annexe N°3) ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant des milieux appropriés. A cet effet au LRM on utilise les milieux suivants pour la réalisation de subcultures à partir des flacons d'hémoculture :

- a. La gélose chocolat polyvitex ; (milieu enrichi sur lequel pratiquement toutes les bactéries poussent même les plus exigeantes) ;
- b. La gélose au sang frais (gélose COS) ;
- c. La gélose Drigalski (milieu sélectif pour les bacilles à Gram négatif) ;
- d. La gélose UriSelect (sur laquelle toutes les bactéries se développent sous différentes colorations) ;
- e. La gélose Sabouraud (spécifique pour les levures et les champignons) ;
- f. La gélose Chapman (MSA) un milieu sélectif pour le staphylocoque ;

2. On procède à la lecture de la coloration de Gram :

- a. Si aucun microorganisme n'est détecté au Gram, on remet le flacon dans l'automate. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, une goutte de bouillon doit être mise en subculture sur les différentes boîtes de géloses citées ci-dessus. Les boîtes et le flacon sont incubés et observés pendant 7 jours (à compter de l'incubation du flacon). Le flacon n'est plus mis en culture si au bout de ces 7 jours aucun microorganisme n'a toujours pas été identifié.
- b. Lorsque des microorganismes sont détectés, ne plus remettre le flacon dans l'automate. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPch, CGPpr, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...).

3. Le médecin pratiquant est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram.

4. Quand des cocci à Gram positif en paires ou en chaînettes sont observées, on place un disque de Bacitracine (A) et un disque d'Optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture.

5. Les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>.

Si la coloration de Gram est positive, le flacon est incubé avec les boîtes.

6. Si une croissance est observées, reporter sur la fiche de travail le références des boîtes dans lesquels les colonies ont été observées. Ensuite on fait une coloration de Gram sur ces colonies et reporte les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs types de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté.

7. Lorsque des cocci à Gram positif sont observées, on se réfère au mode opératoire comme suit :

a. enregistrer les résultats des tests des disques d'Optochine et de Bacitracine ainsi que le test de la catalase ;

b. si le microorganisme est catalase positive et ressemble au Staphylocoque (cocci à Gram positif en grappe), faire un test de coagulase. Si le microorganisme est coagulase-positif, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le microorganisme est coagulase négative après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative ;

c. quand le microorganisme est catalase négative, beta-hémolytique et Bacitracine-positif (inhibé par la Bacitracine), enregistrer le microorganisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;

d. au cas où le test à la Bacitracine ou à la catalase est flou, faire un PYR test. Si le PYR test est positif, alors enregistrer le microorganisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;

e. lorsque le microorganisme est catalase négative, beta-hémolytique et Bacitracine négatif, on fait les tests d'agglutination des Streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le microorganisme comme étant *Streptococcus* beta-hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable en fonction du résultat des tests d'agglutination ;

f. si le microorganisme est catalase négative, Optochine positif (inhibé par le disque d'Optochine) et diplocoque à Gram positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'Optochine est négatif ou non concluant, faire un test de « bile solubility ». Si le test de solubilité par la bile est positif, alors enregistrer le microorganisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;

g. quand le microorganisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci à Gram positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'Optochine et négatif au test de solubilité par la bile alors on effectue le PYR test ;

h. au cas où le PYR test est positif, enregistrer le microorganisme comme étant *Enterococcus* species. Si le résultat du PYR test est négatif, alors on enregistre le microorganisme comme étant *Streptococcus* alpha ou gamma hémolytique selon la réaction d'hémolyse.

8. Lorsque le microorganisme est un bacille à Gram positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer tout simplement « Bacille à Gram positif ».

9. Si des bactéries à Gram négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme

a. si le microorganisme pousse sur la gélose au sang et sur la gélose Drigalski, on fait un test d'oxydase et inocule une galerie API 20 E en cas d'oxydase négative. Les Enterobacteriaceae

(tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase négatives ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positives.

b. lorsque le microorganisme ne pousse que sur gélose au sang frais et sur la gélose chocolat Polyvitex mais ne pousse pas sur gélose Drigalski et est diplocoque à Gram négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, le confirmer par un test de sérotypage ;

c. si le microorganisme ne pousse que sur la gélose chocolat Polyvitex mais pas sur gélose Drigalski et se présente comme de petits bacilles à Gram négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*. On fait un test d'oxydase et un test de facteurs X et V. Dans le cas où l'identification indique *Haemophilus influenzae*, on le confirme par un test de sérotypage.

10. Après identification Nous avons procédé à un antibiogramme par la méthode de diffusion sur disques selon Kirby-Bauer.

11. On enregistre le résultat dans le registre de laboratoire et informe le médecin du patient de l'identification finale.

#### 4.8.2. Méthodes d'identification des bactéries

##### 4.8.2.1. Coloration de Gram :

**Procédure :** (voir annexe N°3)

##### **Interprétation :**

La clé dans l'interprétation de la coloration de Gram est d'identifier la morphologie des microorganismes (exemple : cocci, bacilles) ainsi que leur relation les uns par rapport aux autres (exemple : cellules isolées, paires, en chainettes et en grappes). La reconnaissance de ces caractéristiques peut aider à l'interprétation de la coloration de Gram. Par exemple :

- Cocci à Gram positif en chainettes = Streptocoques.
- Cocci à Gram positif en paires = *Streptococcus pneumoniae* ou *Enterococcus*
- Bacilles à Gram positif = plusieurs microorganismes

Note : Il existe plusieurs bacilles à Gram positif dont *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*.

- Cocci à Gram négatif en paires = *Neisseria*

Note : Les cocci à Gram négatif les plus connus sont arrangés en pairs (Diplocoques) et attachés par leur côté. Ils ressemblent à des grains de café.

- Bacilles à Gram négatif = plusieurs microorganismes.

#### 4.8.2.2. Tests biochimiques et métaboliques :

##### 4.8.2.2.1. Observation de la réaction d'hémolyse :

L'habileté des bactéries à lyser les cellules du sang contenues dans la gélose au sang frais est une caractéristique importante et utile pour leur identification.

Quelques bactéries ont besoin de plus d'un jour avant que ne soit observée une lyse des cellules du sang. Il faut une attention particulière pour observer la lyse des cellules.

Typiquement, trois formes de lyse sont observées :

**Beta-hémolyse :** C'est une lyse complète des globules rouge du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra clair.

**Alpha-hémolyse :** C'est une lyse complète des globules rouge du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra verdâtre.

**Hémolyse Gamma :** ce n'est pas une lyse des cellules du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra normal. Dans ce cas il n'existe aucune évidence de lyse des globules rouges et aucune clarté ou aspect verdâtre n'est observée autour des colonies.

- Parmi les exemples de bactéries Beta-hémolytique on retient les Streptocoque du groupe A et B, le *Staphylococcus aureus* ainsi que *Escherichia coli* ;
- Parmi les exemples de bactéries alpha-hémolytique on retient le *Streptococcus pneumoniae* et quelques autres espèces de *Streptococcus* ;
- Parmi le exemple de bactéries Gamma ou non hémolytique on retient quelques espèces de Streptocoques ainsi que *Neisseria meningitidis*.

##### 4.8.2.2.2. Test de catalase :

**Principe :** Le test de catalase est un examen important pour identifier les microorganismes, en particulier les bactéries à Gram positif. Cette enzyme est utilisée par les microorganismes, aérobies pour se protéger des produits toxiques de la croissance en aérobiose (c'est-à-dire peroxyde d'hydrogène). L'enzyme de la catalase peut convertir le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Une façon facile de mesurer la catalase est de mélanger la bactérie avec une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène. Si la catalase est présente, des bulles d'oxygène se produisent.

##### **Matériels et réactifs utilisés :**

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

**Procédure :** (voir annexe N°4)

Le test de la catalase est plus utilisé pour distinguer les Staphylocoques des Streptocoques.

Note : Les globules contenus dans la gélose au sang contiennent de la catalase et donneront une fausse réaction positive.

#### 4.8.2.2.3. Test de coagulase :

**Principe :** Le BBL Coagulase Plasma, Rabbit (Plasma de lapin pour test de la coagulase BBL) servent à déterminer qualitativement la pathogénicité des staphylocoques par la méthode directe en tube. Cette méthode consiste à mélanger une culture en bouillon de la veille ou des colonies prélevées sur une boîte de gélose non inhibitrice dans un tube de coagulase plasma réhydraté. Le tube est incubé à 37°C, la formation d'un caillot dans le plasma indique une production de coagulase.

#### **Matériels et réactifs utilisés :**

Plasma de lapin lyophilisé contenant environ 0,85% de citrate de sodium et 0,85% de chlorure de sodium ;

Tube sec ;

Anse ;

Souche pure ;

Bec bunsen ;

Portoir tube ;

Etuve ;

Chronomètre

**Procédure :** (voir annexe N°5)

Le test de coagulase est utilisé pour distinguer le *Staphylococcus aureus* de tous les autres *Staphylococcus* (exemple : *Staphylococcus* à coagulase négatif appelé *Staphylococcus spp*). Ceci est une distinction importante parce que le *Staphylococcus aureus* est l'espèce qui est responsable de la plupart des infections.

#### 4.8.2.2.4. Test à l'Optochine :

**Principe :** Le test à l'Optochine est une procédure simple utilisée pour l'identification du *Streptococcus pneumoniae*. Le disque P contient l'éthylhydrocupréine qui inhibe la croissance de *Streptococcus pneumoniae*. Avant l'exécution du test, il convient de confirmer la ressemblance du microorganisme à *Streptococcus pneumoniae*, c'est-à-dire diplocoques à

Gram positif qui apparaissent allongés et attachés par leurs bouts. Les colonies sont alpha-hémolytiques, et peuvent apparaître aussi bien que muqueuses.

**Matériels et réactifs utilisés :**

Disque d'Optochine (P)

Gélose au sang

Anse

**Procédure :** (voir annexe N°6)

**Interprétation :**

Réaction positive = Inhibition de la croissance autour du disque d'Optochine. La zone d'inhibition devrait être supérieure ou égale à 15mm.

Réaction négative = Zone d'inhibition autour du disque d'Optochine moins de 15mm (compris entre 6 et 15mm).

Un résultat positif indique la présence de *Streptococcus pneumoniae*.

Un résultat négatif n'exclut pas le *Streptococcus pneumoniae* ainsi toutes les réactions négatives devraient être confirmées par un test de « bile solubility ». Si le test d'Optochine et celui de « bile solubility » sont tous les deux négatif, le microorganisme identifié n'est pas *Streptococcus pneumoniae*. Si l'un ou l'autre des tests deux est positif, le microorganisme est identifié comme étant *Streptococcus pneumoniae*.

Toutefois, la méthode automatisée nous permet également d'identifier les germes lorsque la méthode classique présente des limites ou ne donne pas de résultats suffisamment clairs. Il suffit de préparer dans un tube à hémolyse une suspension bactérienne à 0,5Mc Ferland, et de se servir de la carte VITEK pour l'identification correspondant à la nature du germe étudié. Ensuite introduire la cassette portant la carte dans l'automate (VITEK 2 compact).

(Voir annexe N°7)

Il existe de nombreuses cartes VITEK pour l'identification, dont :

- Streptocoques et entérocoques : ID : AST-GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276 ;
- GN : ID : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST-222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117 ;
- GP : ID : réf 21342 ; ATB :AST-P 580, réf 22233 ;

Levures: ID: YST, réf 21343; ATB: AST- Y501, réf 22108.



**Figure 4: VITEK 2 compact** (Source: Wikipédia consultée le 20 janvier 2018)

#### **4.8.3. Test de sensibilité aux antibiotiques :**

##### **4.8.3.1. Méthode de diffusion sur disques d'antibiotiques selon Kirby-Bauer :**

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion sur disques d'antibiotiques in vitro selon Kirby Bauer pour tester la sensibilité, d'importants isolats en clinique. Les résultats de cet examen peuvent aider les médecins dans la sélection de l'antibiotique approprié pour la thérapie.

##### **Principe :**

La méthode de diffusion sur disques selon Kirby-Bauer est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du microorganisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du microorganisme. En standardisant les conditions du test (exemple :

préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du microorganisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du microorganisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus le microorganisme est sensible).

Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon les résultats ne seront pas précis.

#### **Matériels et réactifs utilisés :**

Gélose Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval (MHA-B)

Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)

Solution saline stérile à 0,85%

Standard 0,5 de Mc Ferland

Disques antibiotiques pour test de sensibilité

Ecouvillons en coton stériles

Pipetes à sérum

Pinces à disques et/ou applicateur du disque.

#### **Conditions de stockage nécessaires :**

- Milieux de culture (MHA- B et HTM) : A conserver au réfrigérateur, ils doivent être réchauffés à la température de la salle avant leur utilisation. Les boîtes non- stockées dans des sacs en plastique se déshydrateront et ne pourront pas être utilisées convenablement ;
- Solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur ;
- Standard 0,5 de Mc Ferland : A conserver au noir dans un récipient. Ne pas utiliser de tube rayé. Le diamètre du tube doit être le même que celui des tubes de solution saline utilisés pour la préparation des tests d'inoculum ;
- Disques d'antibiotiques : Congeler les disques à  $-4^{\circ}\text{C}$  ou à une température plus basse ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) pour de longue conservation ;
- Dès qu'une boîte est ouverte pour usage, elle peut être conservée au réfrigérateur dans une capsule bleue de 50 ml ensemble avec le dessiccateur.

**Procédure du test :** Selon Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM/EUCAST) version 2017.

#### **Interprétation :**

- Tous les tests de sensibilité sont lus après 24 heures d'incubation. Si les tests sont lus plutôt qu'après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis ;
- On mesure les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte ou en utilisant tout simplement un pied à coulisse.

- La limite est l'aire dans laquelle une croissance évidente est visible à l'œil nu, excepté la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.

#### **4.8.3.2. L'antibiogramme à partir de l'automate VITEK 2 compact :**

Ce procédé définit l'utilisation de cartes près à l'emploi, qui servent à la réalisation de l'antibiogramme. En effet, les cartes sont constituées de 36 puits et permettent de tester de dix-huit antibiotiques appartenant à différentes familles. Les résultats de cette méthode hautement fiable, peuvent guider le praticien dans le choix d'une antibiothérapie de qualité efficace.

##### **Principe :**

Le système VITEK 2 compact est destiné à l'identification des bactéries et des levures ; ainsi qu'à la réalisation d'antibiogramme pour les bactéries significatives sur le plan clinique. Le système comprend l'instrument VITEK 2 compact, un ordinateur et une imprimante. Le logiciel fourni avec le système VITEK 2 compact inclut des programmes d'analyse et de gestion des données. Une interface informatique bidirectionnelle transfère automatiquement les résultats vers le système d'information de laboratoire de l'utilisateur (LIS) et vers divers rapports de produits et de patients.

**Procédure :** (voir annexe N°7)

##### **Interprétation :**

- Tous les tests de sensibilité sont lus après 24 heures d'incubation. Si les tests sont lus plutôt ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis ;
- L'automate rend les résultats de l'antibiogramme lui-même, en précisant si le germe est sensible ; intermédiaire ou résistant à tel ou tel autre antibiotique ;
- En cas de multi résistance, la confirmation qu'il s'agit d'une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) est faite par l'appareil lui-même ou par la méthode de recherche d'un bouchon de champagne sur la gélose Muller-Hinton.

#### **4.8.3.3. Conservation de souches :**

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures de différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souche de référence. Elles sont fréquemment utilisées pour l'enseignement, le contrôle ou la recherche. Il convient de les congeler à la température la plus basse et d'y parvenir dans les plus brefs délais. Les souches sont conservées dans un congélateur de - 84°C.

**4.9. Analyse des données :**

Le logiciel Microsoft Word 2013 a servi pour la rédaction et L'analyses des données a été fait à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistic version 20. Les tableaux, les figures et les graphiques ont été réalisés à l'aide du Microsoft Office Excel 2013.

**4.10. Aspects éthiques :**

L'anonymat et la confidentialité des patients ont été respectés conformément aux règles d'éthique médicale. En effet les noms et les prénoms des patients n'ont pas été mentionnés dans aucun document permettant de faire le lien avec le résultat.

## **V. RESULTATS**

## 5. Résultats

### 5.1. Résultats globaux :

Au total 359 prélèvements sanguins ont été adressés au LRM de Bamako pour hémoculture de janvier 2016 à décembre 2017. Parmi ces hémocultures, on a eu 89 cas de positivité soit 25% des hémocultures, 52 ont été considérées comme contaminées soit 58% des hémocultures positives et 15% des hémocultures réalisées. Ainsi 37 échantillons ont été considérés comme des vraies bactériémies soit 42% des hémocultures positives et 10% du nombre totale des hémocultures.

#### 5.1.1. Distribution des patients selon leur provenance.

**Tableau I : Répartition des demandes d'hémocultures selon la provenance**

Provenance	Hémocultures		
	Positives %	Négatives %	Total
Communautaire	65 (18,10%)	158 (44,01%)	223 (62,11%)
Hospitalière	14 (3,9%)	30 (8,39%)	44 (12,29%)
Non Spécifiée	10 (2,77%)	82 (22,83%)	92 (25,60%)
Total	89	270	359 (100%)

$X^2 = 0,12$  ; ddl = 1 ; p = 0,72

La majorité des hémocultures étaient d'origine communautaire avec 62,11%.

### 5.1.2. Distribution des patients selon le sexe.

**Tableau II : Répartition des demandes d'hémocultures selon le sexe.**

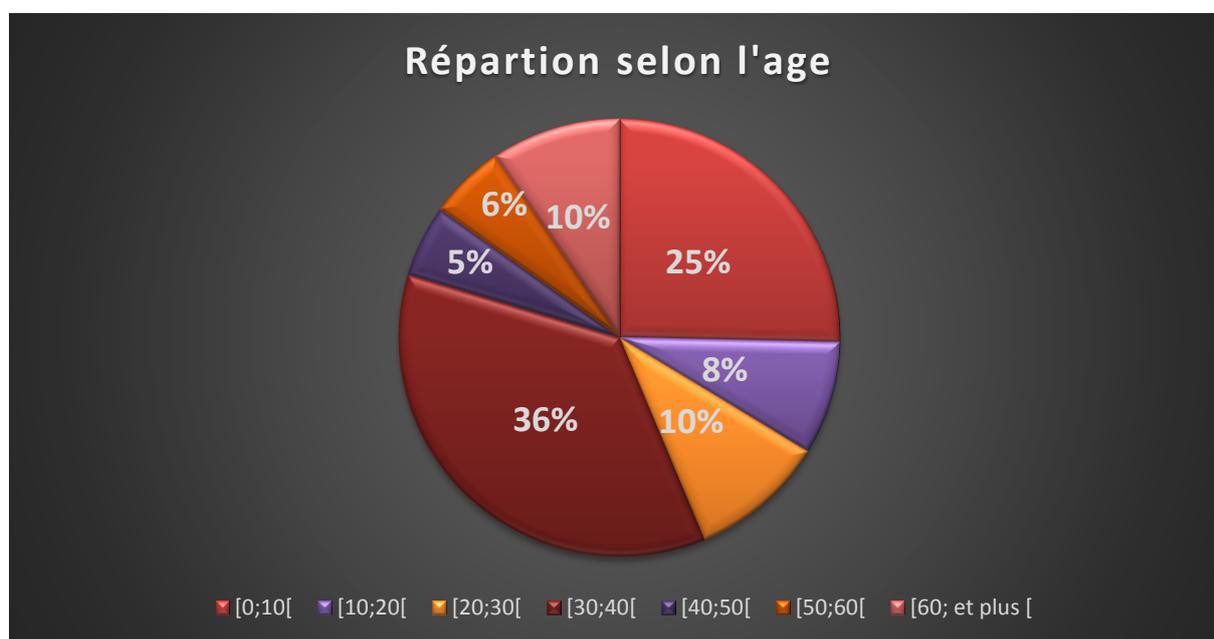
Sexe	Hémocultures		
	Positives %	Négatives %	Total
Masculin	66 (18,40%)	180 (50,13%)	246 (68,53%)
Féminin	23 (6,40%)	90 (25,07%)	113 (31,47%)
Total	89 (24,81)	270 (75,20)	359 (100%)

$$X^2 = 1,74 ; \text{ddl} = 1 ; p = 0,18$$

Le sex- ratio des patients étaient de 3 hommes pour une femme.

L'analyse de ce tableau montre que la majorité des demandes d'hémoculture provenait des hommes avec 68,53%.

### 5.1.3. Distribution des patients selon la tranche d'âge.



**Figure 5 : Distribution des hémocultures en fonction de la tranche d'âge.**

La majorité de nos patients était comprise dans la tranche d'âge de 30-40 ans soit 36% des hémocultures.

## 5.2. Résultats descriptifs :

### 5.2.1. Distribution annuelle des hémocultures positives au LRM de janvier 2016 à décembre 2017.

**Tableau III: Répartition annuelle des hémocultures au LRM.**

Années	Hémocultures		Total
	Positives	Négatives	
2016	73 (20,33%)	161	234
2017	16 (4,67%)	109	125
Total	89	270	359

L'analyse de ce tableau montre que les hémocultures positives étaient plus nombreuses en 2016 avec 20,33%.

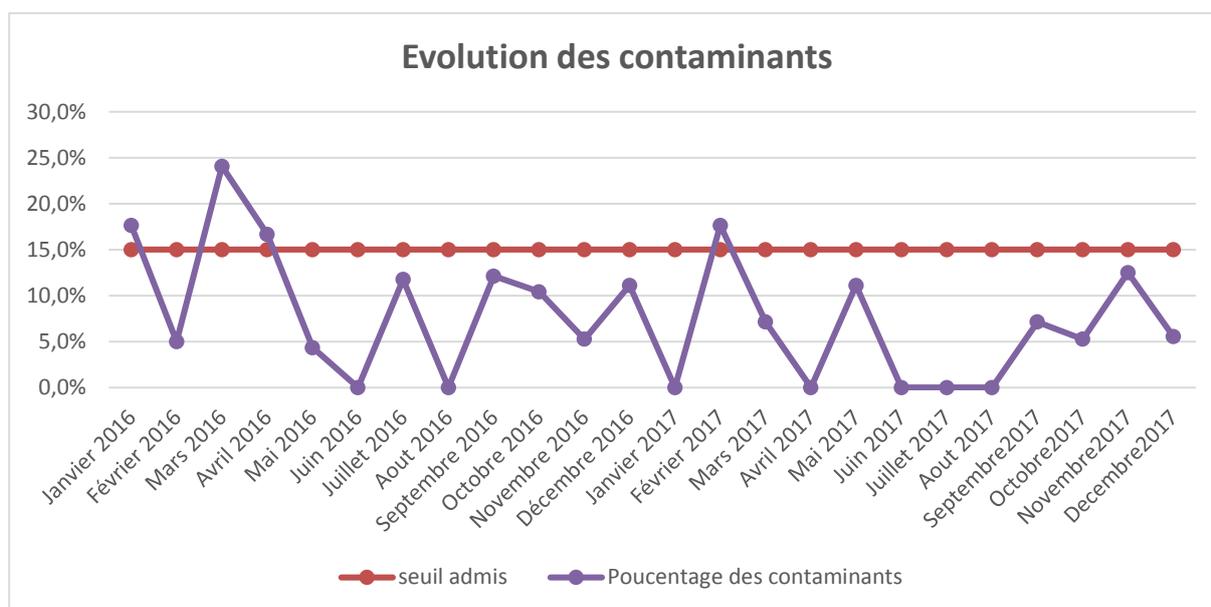
### 5.2.2. Distribution des germes isolés des hémocultures.

**Tableau IV : Répartition des germes isolés des hémocultures de janvier 2016 à décembre 2017.**

Genre	Espèce	Effectif	Fréquence
Bacilles à Gram négatif	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	3	3,3
	<i>Burkholderia cepacia</i>	1	1,1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2,2
	<i>Escherichia coli</i>	9	10
	<i>Salmonella Typhi</i>	5	5,5
	<i>Salmonella enterica</i>	5	5,5
	<i>Gamella morbilorum</i>	1	1,1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	5,5
Bacilles à Gram positif	<i>Bacillus</i>	3	3,3
Cocci à Gram positif	<i>Alloicoccus otitis</i>	1	1,1
	<i>Kocuria Spp</i>	3	3,3
	<i>Micrococcus spp</i>	7	7,7
	<i>Staphylococcus</i> à coagulase négative	37	40,5
	<i>Staphylococcus aureus</i>	7	7,7
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	1,1
Levure	<i>Candida albicans</i>	1	1,1
Total		91	100

Les résultats de ce tableau montrent que les cocci à Gram positif sont majoritairement isolés dans les hémocultures positives avec 60,4%.

### 5.2.3. Evolution de la contamination des hémocultures selon le mois.



**Figure 6: Courbe d'évolution des contaminants d'hémoculture de janvier 2016 à décembre 2017 au LRM de Bamako.**

L'analyse de cette figure montre que les contaminants étaient supérieurs au seuil admis en janvier, mars et avril 2016 et février 2017.

### 5.2.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

#### ➤ Les bacilles à Gram négatif :

##### Les entérobactéries :

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et les *Salmonella* ont été les entérobactéries isolées des hémocultures pendant notre étude.

**Tableau V : Fréquence de la résistance aux Bétalactamines des entérobactéries isolées.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i>
AMOX	2(100%)	8(100%)	5(100%)	0%	0%
AMC	2(100%)	6(75%)	4(80%)	0%	0%
TIC	1(50%)	8(100%)	5(100%)	0%	0%
TZP	1(50%)	4(66,66%)	2(100%)	0%	0%
IMI	0%	0%	0%	0%	0%
CFT	2(100%)	5(62,50%)	3(75%)	0%	0%
CEF	2(100%)	2(33,33%)	2(40%)	0%	0%
CAZ	1(50%)	5(62,50%)	3(60%)	0%	0%
CTX	5(50%)	4(57,14%)	3(60%)	0%	0%

AMOX=Amoxicilline ; AMC=Amoxicilline/Acide Clavulanique ; TIC=Ticarcelline ; TZP=Pipéracilline/Tazobactam ; IMI=Imipénème ; CFT=Cefoxitine ; CEF=Cefalotine ; CAZ=Ceftazidime ; CTX=Cefotaxime.

Les résultats de ce tableau confirment la résistance naturelle de certaines de nos souches d'entérobactéries isolées à AMOX, AMC, TIC et CEF. Nous avons constaté une résistance très élevée de ces souches aux Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération et une sensibilité totale à l'IMI.

**Tableau VI : Fréquence de la résistance aux Aminosides des entérobactéries isolées.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i>
TOB	1(50%)	3(42,85%)	2(50%)	0%	0%
GEN	1(50%)	3(42,85%)	3(60%)	0%	0%
AKN	1(50%)	2(28,57%)	5(25%)	0%	0%

TOB= Tobramicine ; GEN=Gentamicine ; AKN=Akamicine.

Au moins 25% des souches d'entérobactéries isolées au LRM étaient résistantes aux aminosides testés excepté le genre *Salmonella*.

**Tableau VII: Fréquence de la résistance aux Quinolones des entérobactéries isolées.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella Typhi</i>	<i>Salmonella enterica</i>
NAL	1(50%)	6(75%)	2(40%)	0%	0%
CIP	1(50%)	5(62,50%)	1(33,33%)	0%	0%
NOR	0%	2(100%)	1(50%)	0%	0%

NAL=Acide Nalidixique ; CIP=Ciprofloxacine ; NOR=Norfloxacine.

A l'exception des espèces de *Salmonella* toutes les entérobactéries isolées présentaient une résistance élevée aux quinolones testés.

#### **Les BGN non fermentaires :**

Les espèces *Acinetobacter baumannii complex* et *Burkholderia cepacia* ont été les bacilles à Gram négatif non fermentaires isolés des hémocultures.

**Tableau VIII : Fréquence de la résistance aux Bétalactamines testés des BGN non fermentaires isolés.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
TIC	1(50%)	1(100%)
TCC	Nd	1(100%)
PIP	1(100%)	1(100%)
CAZ	2(66,66%)	1(100%)

TIC=Ticarcline ; TCC=Ticarcline/Acide clavulanique ; PIP=Pipéracilline ;

CAZ=Ceftazidime ; Nd=non déterminé.

L'examen de ce tableau montre que la majorité des BGN non fermentaires isolés étaient très résistants aux bétalactamines testés.

**Tableau IX : Fréquence de la résistance aux Aminosides des BGN non fermentaires isolés.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
TOB	1(33,33%)	1(100%)
GEN	2(66,66%)	1(100%)

TOB= Tobramicine ; GEN=Gentamicine.

Les BGN non fermentaires isolés ont exprimé des résistances relativement élevées vis à vis des aminosides testés.

**Tableau X : Fréquence de la résistance aux Quinolones des BGN non fermentaires isolés.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
CIP	1(33,33%)	1(100%)

Les BGN non fermentaires isolés présentait une résistance élevée aux quinolones testés.

➤ **Les cocci à Gram positif :**

*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae* ont été les cocci à Gram positif pathogènes isolés des hémocultures au LRM de Bamako pendant notre étude.

**Tableau XI : Fréquence de la résistance aux antibiotiques des cocci à Gram positif isolés.**

<b>Antibiotiques</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TOB	0%	Nd
GEN	0%	Nd
KAN	0%	Nd
PEN	7(100%)	0%
OXA	0%	0%
ERY	1(16,67%)	0%
VAN	0%	0%
TEC	0%	0%
FOS	0%	Nd
FUC	1(16,67%)	Nd
SXT	0%	Nd

TOB= Tobramicine ; GEN=Gentamicine ; KAN=Kanamycine ; PEN=Pénicilline ;  
 OXA=Oxacilline ; ERY=Erythromycine ; VAN=Vancomycine ; TEC=Teicoplanine ;  
 FOS=Fosfomycine ; FUC=Acide fusidique ; SXT=Cotrimoxazole ; Nd=non déterminé

Les cocci à Gram positif isolés étaient sensibles à tous les antibiotiques testés excepté la Pénicilline, l'Erythromycine et l'Acide fusidique.

**Tableau XII : Evolution de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries selon l'année.**

Familles	ATB	2016			2017	
		<i>E. cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Bétilactamines	TZP	1(50%)	4(80%)	2(100%)	Nd	Nd
	IMI	0	0	0	0	0
	CFT	1(50%)	3(50%)	3(100%)	2(100%)	0
	CAZ	1(50%)	3(50%)	2(66,66%)	3(100%)	1(50%)
	CTX	1(50%)	2(40%)	2(66,66%)	3(100%)	1(50%)
Aminosides	TOB	1(50%)	2(33,33%)	2(66,66%)	1(100%)	0
	GEN	1(50%)	2(33,33%)	2(66,66%)	2(100%)	1(50%)
	AKN	1(50%)	2(33,33%)	0	0	1(50%)
Quinolones	NAL	1(50%)	4(80%)	1(33,33%)	3(100%)	1(50%)
	CIP	1(50%)	3(50%)	1(33,33%)	2(100%)	0
	NOR	0	1(100%)	Nd	1(100%)	1(50%)
Autres	SXT	1(50%)	6(100%)	2(66,66%)	2(100%)	1(50%)
	FOS	0	0	Nd	0	1(100%)

Nd=non déterminé, TZP=Pipéracilline/Tazobactam ; IMI=Imipénème ; CFT=Cefoxitine ; CAZ=Ceftazidime ; CTX=Cefotaxime ; TOB=Tobramicine ; GEN=Gentamicine ; AKN=Akamicine ; NAL=Acide Nalidixique ; CIP=Ciprofloxacine ; NOR=Norfloxacine ; SXT=Triméthoprime/sulfaméthoxazole ; FOS=Fosfomycine.

Nous avons observé une résistance élevée des souches d'*Enterobacter cloacae* et *Klebsiella pneumoniae* en 2016 qu'en 2017. Et une résistance plus élevée des souches d'*Escherichia coli* en 2017 qu'en 2016.

**Tableau XIII : Evolution de la résistance aux antibiotiques des BGN non fermentaires.**

Familles	ATB	2016		2017
		<i>A. baumannii complex</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>A. baumannii complex</i>
Bétalactamines	TIC	1(50%)	1(100%)	Nd
	TCC	Nd	1(100%)	Nd
	PIP	Nd	1(100%)	1(100%)
	CAZ	1(50%)	1(100%)	1(100%)
Aminosides	TOB	1(50%)	1(100%)	0
	GEN	1(50%)	1(100%)	1(100%)
Quinolones	CIP	0	1(100%)	1(100%)
Autres	SXT	0	Nd	1(100%)
	COL	0	1(100%)	Nd

Nd : non déterminé ; TIC=Ticarcilline ; TCC=Ticarcilline/Acide clavulanique ; PIP=Pipéracilline ; CAZ=Ceftazidime ; TOB=Tobramicine ; GEN=Gentamicine ; CIP=Ciprofloxacine ; SXT=Triméthoprime/sulfaméthoxazole ; COL = Colistine.

L'analyse de ce tableau montre une résistance plus supérieure des souches *d'Acinetobacter baumannii complex* en 2017 qu'en 2016

## **VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

## 6. Commentaires et discussion :

L'objectif de ce travail était d'identifier les bactéries responsables de septicémies et d'étudier la résistance aux antibiotiques des principales bactéries en cause au LRM de Bamako. Pour cela nous avons adoptés comme méthodologie d'isoler les souches pathogènes et d'évaluer leur résistances aux antibiotiques pendant 24 mois.

### En ce qui concerne la fréquence de l'hémoculture:

De nombreuses automates étaient utilisées pour la détection des microorganismes susceptible de se développer dans le sang. Nous avons utilisés dans notre étude les services du BacT/ALERT 3D de chez bio Mérieux.

Au total, 359 prélèvements sanguins pour examen d'hémoculture ont été colligés au Laboratoire Rodolphe Mérieux de janvier 2016 à décembre 2017. Dans notre étude les hémocultures positives étaient au nombre de 89, soit un pourcentage de positivité de 25%.

Un taux de positivité supérieur a été rapporté par Moudjongue OS en 2014 avec 28,6% d'hémocultures positives (9) et Yattara AA avec 44% en 2016 (28). Samaké M, en 2004 avait rapporté 585 cas positive sur 2198 hémocultures, soit un pourcentage 26,61% (29).

### Du point de vue contaminations :

- **Taux de contamination :**

La contamination des flacons d'hémoculture lors du prélèvement est un problème important, vu que sur l'ensemble des hémocultures positives, les contaminations représentent 58% dans notre étude et 15% du nombre total des hémocultures réalisés.

Au laboratoire de l'hôpital Cheick Zaid à Rabat, Berrezzouk M en 2008 avait un échantillon total de 539 prélèvements pour hémoculture à analyser. Cette étude réalisée en 2008 avait rapporté un taux de contamination de 22,8% des hémocultures positives et 8,61% du nombre total des hémocultures. En effet, un taux de contamination nettement inférieur à celui de ce travail a été rapporté par Berrezzouk M (30). Moudjongue OS avait rapporté un taux de contamination de 18,9% en 2014 au LRM ce qui est aussi supérieur à ce qui a été observé au cours de notre étude (9).

- **Source de contamination :**

La contamination des hémocultures peut se réaliser pendant la pratique de l'hémoculture c'est-à-dire pendant le prélèvement ou au cours de l'inoculation du flacon d'hémoculture. Dans la majorité des cas, la contamination se fait lors des prélèvements sanguins et résulte d'une asepsie insuffisante. En effet, l'asepsie rigoureuse de la zone de ponction à l'aide de solutions alcooliques de façon centrifuge, la désinfection des bouchons des flacons d'hémoculture, des

mains de l'opérateur ainsi que le port des gants et la réduction de parole (ou le port de masque type chirurgical) lors du prélèvement sont des mesures efficaces qui permettent de réduire considérablement la contamination des hémocultures.

### **En ce qui concerne l'identification et test de sensibilité des germes isolés :**

L'identification des espèces bactériennes isolées avait été faite sur la base de leurs caractères morphologiques, biochimiques et culturaux. En effet, la coloration de Gram et la culture sur géloses spécifiques nous avait permis d'avoir une idée sur la nature du germe isolé. L'identification des espèces bactériennes isolées avait été faite par l'automate VITEK 2 compact.

Moudjongue OS s'était servie des automates VITEK 2 compact et Mini API pour l'identification des bactéries isolées des hémocultures (9). Koné SM, en 2010 avait utilisée la galerie API 20 E pour l'identification des entérobactéries isolées des hémocultures (26) ainsi que Niandou MT en 2005, pour l'identification des entérobactéries dans les hémocultures mais aussi dans d'autres prélèvements (31).

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des espèces bactériennes isolées dans notre étude avait été faite par la méthode de diffusion sur disques d'antibiotiques sur gélose Muller-Hinton.

Moudjongue OS en 2014 avait utilisée les automates VITEK 2 compact et Mini API pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (9), alors que Naindou MT en 2005 avait utilisé la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Muller-Hinton dans l'étude de la sensibilité des bactéries isolées des hémocultures (31) tout comme Koné SM en 2010 (27). De nos jours toutes ces méthodes donnent des résultats fiables mais l'identification manuelle est plus limitée que la méthode automatisée.

### **Du point de vue de l'étude de la résistance aux antibiotiques :**

#### **Les Bétalactamines :**

Compte tenu de la résistance naturelle de certaines de nos souche tels, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* à l'Amoxicilline et à l'Amoxicilline/Acide clavulanique ; *Enterobacter cloacae* à l'Amoxicilline, à l'Amoxicilline/Acide clavulanique, à la Ticarcilline, à la Cefalotine et à la Cefoxitine.

Les bactéries isolées pendant notre étude ont présentées des fort taux de résistance aux Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération notamment *Escherichia coli* avec respectivement 62,5%, 57,14% et 62,5% pour la Cefoxitine, la Cefotaxime et Ceftazidime ; *Klebsiella pneumoniae* avec respectivement 75%, 60% et 60% de résistance pour la Cefoxitine, la Cefotaxime et Ceftazidime et *Acinetobacter baumannii complex* avec 66,66% de résistance à la

Ceftazidime. Des résultats nettement inférieurs à ceux de notre étude avaient été obtenus par Niandou TM en 2005 à Bamako pour *Escherichia coli* avec respectivement 10,4%, 9%, 7% de résistance pour la Cefotaxime, la Ceftazidime et la Cefoxitine et pour *Klebsiella pneumoniae* avec respectivement 27%, 30% et 3% de résistance pour la Cefotaxime, la Ceftazidime et la Cefoxitine (31). Moudjongue OS avait obtenu en 2014 à Bamako 83% de résistance à la Ceftazidime des souches *Acinetobacter baumannii complex* (9).

### Les Aminosides

Les taux de résistance de nos souches aux Aminosides étaient assez élevés notamment pour la Gentamicine avec respectivement 50%, 42,85%, 60%, 66,66% et 100% de résistance pour *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii complex* et *Burkholderia cepacia*. Ces chiffres se rapprochent à ceux obtenus au Maroc par Benzrouil B en 2010 avec respectivement 36,58%, 45,71% et 76,92% de résistance pour *Escherichia coli*, groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* et *Acinetobacter baumannii* (32).

### Les Quinolones

L'étude de la résistance aux Quinolones de nos souches montre un niveau de résistance élevé à l'Acide nalidixique et à la Ciprofloxacine. La résistance à l'Acide nalidixique était respectivement 50%, 75%, 40% pour *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* et celle à la Ciprofloxacine était respectivement 50%, 62,5%, 33,33% et 66,66% pour *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii complex*. Ces pourcentages sont comparable à ceux rapportés par Elmouali A en 2012 à Rabat qui avait respectivement 52% et 19,4% de résistance à la Ciprofloxacine pour les espèces *Acinetobacter baumannii* et *Escherichia coli* et 23,6% de résistance au groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (33). Par contre Niandou TM en 2005 à Bamako avait obtenu respectivement 53%, 38% et 50% de résistance à l'Acide nalidixique pour *Enterobacter sp*, *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae* (31).

E plus de ces familles d'antibiotiques étudiées nous avons observés que respectivement 50%, 100%, 60% et 33,33% de nos souches d'*Enterobacter cloacae*, d'*Escherichia coli*, de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Acinetobacter baumannii complex* étaient résistantes au Triméthoprime-Sulfaméthoxazole. Ces prévalences sont comparables à celles obtenues par Elmouali A en 2012 à Rabat qui avait obtenue respectivement 47,48% et 57,6% de résistances pour *Escherichia coli* et groupe *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (33).

## VII. CONCLUSION

Les résultats d'identification ont montrés que sur 91 souches isolées 38 étaient des souches bactériennes pathogènes dont 30 étaient des bacilles à Gram négatif avec une prédominance des entérobactéries, 8 étaient des cocci à Gram positif.

Il ressort de cette étude un niveau élevé de résistance des souches isolées en particulier les bacilles à Gram négatif aux Céphalosporines de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération notamment la Cefoxitine, la Cefotaxime et la Ceftazidime.

Cependant l'Imipenème, la Fosfomycine la Vancomycine et la Teicoplanine restent les antibiotiques les plus actifs sur les souches isolées. Il faut noter les deux derniers n'ont été testés que sur une minorité de souche.

L'étude nous a également permis d'observer l'évolution des contaminants d'hémoculture au LRM ce qui explique les insuffisances des conditions de prélèvement sanguins au niveau de nos structures sanitaires.

## **VIII. RECOMMANDATIONS**

## **8. Recommandations**

### **Au Ministre de la santé :**

- Mettre en place un programme de lutte contre les infections nosocomiales et des bactéries multi résistantes afin de maîtriser la diffusion des souches BLSE et d'éviter l'évolution vers l'impasse thérapeutique.

### **Au Directeur du centre d'infectiologie Charle Mérieux :**

- Assurer la formation de l'ensemble des techniciens aux bonnes techniques de l'hémoculture ;
- Etablir une collaboration avec les polycliniques afin de leurs informés sur les bonnes pratiques de prélèvement d'hémocultures, diminuant ainsi le taux des contaminants ;
- Instituer avec l'appui du gouvernement de la république, une structure qui serait un pôle de référence dans le diagnostic des bactéries responsables de septicémies.

### **Aux praticiens médicaux :**

- Appliquer les bonnes pratiques de prélèvement sanguin, de prescription et de dispensation des antibiotiques à la population.

### **A la population :**

- Eviter la mauvaise utilisation des antibiotiques et surtout l'automédication afin de diminuer l'émergence de bactéries multi résistantes.

## Fiche signalétique

Nom : SANOGO

Prénom : Fatoumata

Titre de la thèse : Surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries pathogènes isolées des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako.

Année universitaire : 2017-2018

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieux de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Pharmacie (FAPH)

Secteur d'intérêt : Bactériologie, Epidémiologie.

## Résumé

Nous avons réalisé une étude rétro-prospective de janvier 2016 à décembre 2017, chez les patients adressés au LRM pour hémoculture. Nous avons utilisé la méthode automatisée de VITEK 2 compact pour l'identification et la méthode de diffusion sur disques pour la réalisation des antibiogrammes. Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM 2017) ont été utilisées pour l'interprétation des résultats.

Au total 359 hémocultures ont été réalisées, parmi ces hémocultures 89 ont été positives avec un taux de positivité de 25%. Trente-neuf (39) souches bactériennes ont été considérées comme vraie bactériémies soit 10% des hémocultures. Les hémocultures étaient contaminées à 15%.

Les bacilles à Gram négatif ont été les bactéries pathogènes les plus fréquemment isolées soit 76,92% repartit entre *Escherichia coli* (23,07%), *Klebsiella pneumoniae* (12,82%), *Salmonella Typhi* (12,82%), *Salmonella enterica* (12,82%), *Acinetobacter baumannii complex* (7,69%), *Enterobacter cloacae* (5,12%) et *Burkholderia cepacia* (2,56%).

Les Entérobactéries ont été le groupe de bactéries qui présentaient la majorité de bactéries multi résistantes aux antibiotiques.

Un test de sensibilité aux antibiotiques systématique des isolats d'hémocultures est nécessaire pour orienter l'antibiothérapie efficace des septicémies.

**Mots clés** : Hémoculture – Septicémie – Résistance aux antibiotiques – LRM – Bamako.

**Abstract:**

We conducted a retrospective study from January 2016 to December 2017, in patients referred to the LRM for blood culture. We used the compact VITEK 2 automated method for identification and disk diffusion method for performing antibiograms. The recommendations of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM 2017) were used for the interpretation of the results.

A total of 359 blood cultures were performed, of these 89 blood cultures were positive with a positivity rate of 25%. Thirty nine (39) bacterial strains were considered true bacteremia or 10% of blood cultures. Blood cultures were 15% contaminated.

Gram-negative bacilli were the most frequently isolated pathogenic bacteria, ie 76.92% divided between *Escherichia coli* (23.07%), *Klebsiella pneumoniae* (12.82%), *Salmonella Typhi* (12.82%), *Salmonella enterica* (12.82%), *Acinetobacter baumannii* complex ((7.69%), *Enterobacter cloacae* (5.12%) and *Burkholderia cepacia* (2.56%).

Enterobacteria were the group of bacteria that had the majority of multi-antibiotic resistant bacteria.

Systematic antibiotic susceptibility testing of blood culture isolates is necessary to guide the effective antibiotic therapy of sepsis.

**Key words**: Blood culture - Septicemia - Antibiotic resistance - LRM - Bamako

## Références bibliographiques

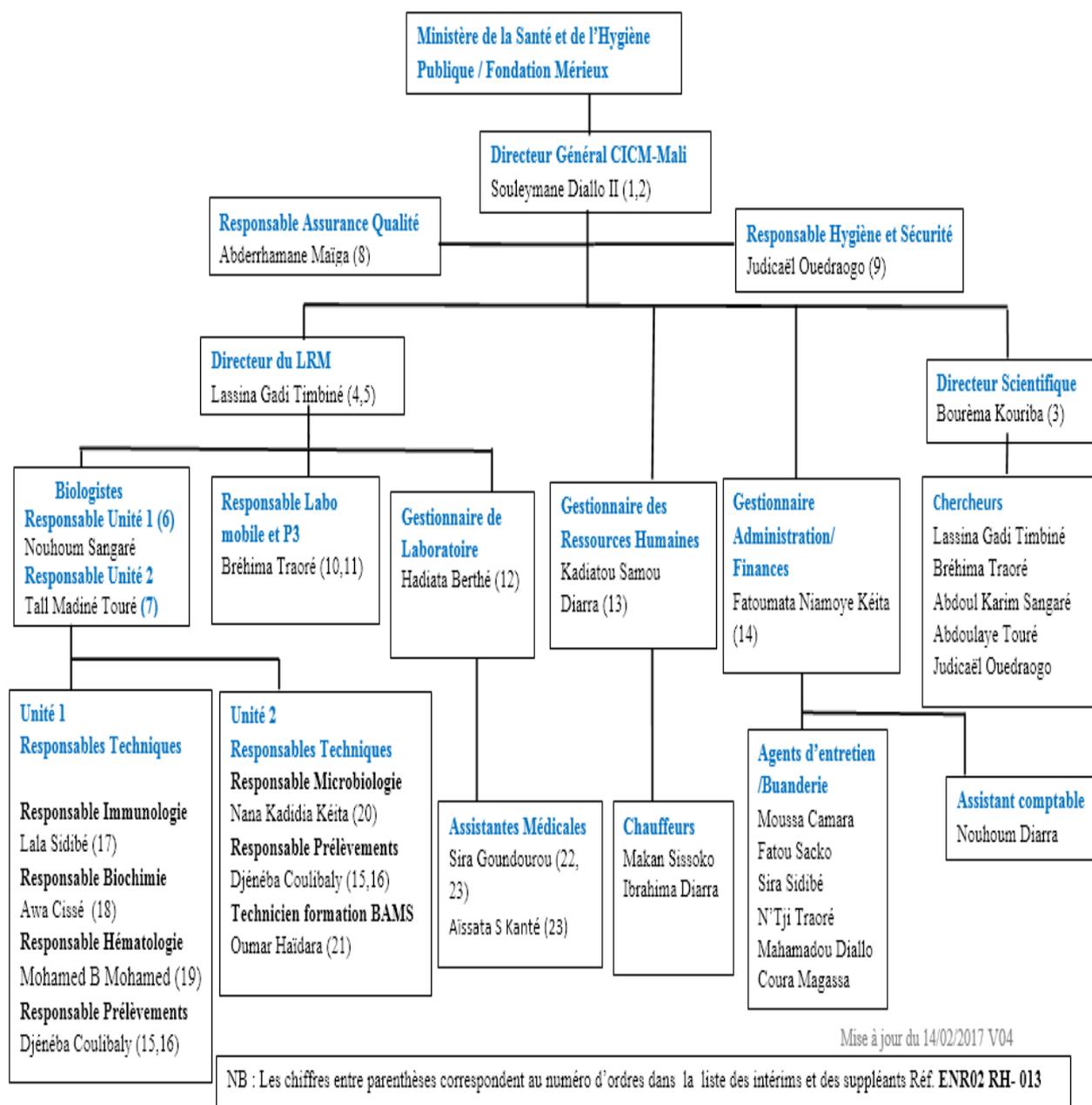
1. Osthoff M, Khanna N, Goldenberger D, Wüscher V, Flückiger U. Hémocultures positives : interprétation et prise en charge initiale. Forum médical Suisse 2016.
2. Dickema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern CV, Sader HS. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection in USA, Canada and Latin America. *Int J Antimicrob Agents* 2000: 257-271
3. Emori TG, Edwards JR, Culver DH et al. Accuracy of reporting nosocomial infections in intensive-care-unit patients to the National Nosocomial Infections Surveillance System: a pilot study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998 May: 308-316
4. Ki-Zerbo GA, Thioub B, Diop BM et al. Etude des hémocultures positives au CHU de Fann Dakar: bilan de trois années du laboratoire de bactériologie. *Med Afr Noir* 1996: 322-329.
5. Anagonou Sy, Akpona S., Josse R., Massougbodji A., et coll.,. Les isollements de bactéries dans les hémocultures au laboratoire bactériologie du C.N.H.U Cotonou (1987-1990). *Med Afr Noire* 1993 ; 40 : 614.
6. Sora N, Zougaghi L, Zahlane K, Admou B. Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémocultures dans un centre hospitalo universitaire marocain. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. Avril 2011; Vol.5, N°2 : 78 - 81.
7. Mahmoud M, Yahyaoui G, Benseddik. Hémocultures: profil bactériologique et sensibilité aux antibiotiques au laboratoire d'analyses médicales et de microbiologie du CHU Hassan II de Fes-Maroc. *Maroc médical*, tome 32 n°2, juin 2010.
8. Gazagne L, Hernandez B, Nougaret A, Vergely S. Guide pratique de la maîtrise des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. *Inter Clin des Hauts Cantons de l'Herault* 2009.
9. Moudjongue OS. Mise en place d'un système de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques: Cas des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako. Université de Bamako, Thèse de pharmacie N°10; 2014.
10. Saye T. Prévalence des entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre élargi au CHU du Point G de 2006 à 2008. Thèse de pharmacie N°12, 2012
11. Fauchère J. Technique de bactériologie clinique. Edition Marketing S.A : 77-79. 1997

12. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=hémoculture&oldid=135229121>. Consulté le 30 Octobre 2017.
13. Contrepois A. Naissance de l'hémoculture. 1995, Rev Prat; 45: 942-947.
14. Fauchère JL, Avril JL. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing S.A.; 2002, Paris.
15. Denis F, Ploy M, Binger C, Quentin R. Bactériologie médicale. 2000.
16. APPIT Bactériémie, sepsis et choc septique. 15ème édition. E. PILLY, Montmorency : 2M2; 1996. p: 19-25
17. Kamoun P, Frejaville J. Guide des examens de laboratoire. 3ème édition. Médecine sciences Flammarion, p: 473-505
18. Leminor L, Verron M. Bactériologie médicale. 2ème édition; 1989, Paris, p: 396-795.
19. Avril J, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3ème édition; 2000. p: 6-60
20. Anagonou S, Akpona S, Josse R, Massougboji A et coll. Les isolements de bactéries dans les hémocultures au laboratoire de bactériologie du CNHU Cotonou (1987-1990). 1993, Med Afr Noire;40: 614-619
21. Vandepite J et coll. Basic laboratory procedures in clinique bacteriology. Genève; 2003. p: 120.
22. Flandrois JP. Bactériologie médicale. Edition Presses Universitaires de Lyon; 1997. p: 107-199.
23. Gastinel P. Précis de bactériologie médicale. Masson, Paris; 1954. p: 12-44.
24. Singleton P, Sainsbury D. Bactériologie. Masson. Paris; 1984, p: 12-44.
25. Bio Mérieux B.V. Bactériologie Mars 2003 Réf: 247003.
26. Becton Dickinson and compagny. BACTEC 9050 Manuel d'utilisation. MA-0103. Réf: 445845.

27. Koné MS. Bilan de sept (7) ans d'hémoculture en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N°13; 2010.
28. Yattara AA. Etiologies des Septicémies d'origine bactériennes à Bamako. Université de Bamako, Thèse de pharmacie N°38; 2016.
29. Samaké M. Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hopital Gabriel Touré: Aspect méthodologique. Université de Bamako, Thèse de pharmacie N°04P06; 2004.
30. Berrezzouk M. Hémoculture: Profil bactériologique et sensibilité aux antibiotiques à propos de 539 prélèvements collectés au laboratoire l'hôpital Cheick zaid à Rabat. Thèse de pharmacie N° 14; 2008.
31. Niandou TM. Sensibilité et évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques. Université de Bamako, Thèse de pharmacie N°05P79; 2005.
32. Benzriouil B. Hémoculture : Profil bactériologique et sensibilité aux antibiotiques à l'hopital Ibn Sina de Rabat, Thèse de pharmacie N°23; 2010.
33. Elmouali A. Hémoculture : Profil bactériologique et antibiorésistance à l'hôpital Ibn Sina de Rabat, Thèse de pharmacie N°64 ; 2012.

## ANNEXES

## Annexe N°1 : Organigramme du Centre d'Infectiologie Charle Mérieux (C.I.C.M.)





## Annexe N°2: MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU BACT/ALERT 3D POUR HEMOCULTURE

Rédigé le:	22/07/2013	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Vérifié le:	14/07/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGA	JO	Visa :
Approuvé le:	14/03/2016	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	14/03/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	14/03/2017	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	14/04/2016			Version N° 1
Date de revue :	14/03/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

**X** Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

**I – Buts**

Décrire l'utilisation en routine du Bact/Alert 3D pour l'hémoculture.

**II - Domaines et personnel concerné**

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

BC : Bactéries Classiques

MB : Mycobactérie

**IV – Références****V – Contenu**

**MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU BACT/ALERT 3D POUR  
HEMOCULTURE**

<b>1.</b>	<b>PRINCIPE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>UTILISATION EN ROUTINE.....</b>	<b>3</b>
	2.1. MISE EN ROUTE.....	3
	2.2. MODEOPERATOIRE.....	4
<b>3.</b>	<b>GESTION DES FLACONS POSITIFS NON CONFIRMÉS (FAUX POSITIF).....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>PROCÉDURE DÉGRADÉE.....</b>	<b>6</b>
<b>6.</b>	<b>VISUALISATION DE LA COURBE D'ÉVOLUTION BACTÉRIENNE.....</b>	<b>6</b>

7.	<b>GESTION DES RÉACTIFS ET CONSOMMABLES.....</b>	<b>6</b>
8.	SE CONFERER A LA NOTICE CONTENUE DANS CHAQUE LOT.....	6
9.	<b>GESTION DES DOCUMENTS.....</b>	<b>7</b>

## **1. Principe**

Le principe est basé sur la détection de la croissance des microorganismes. Si des microorganismes sont présents dans l'échantillon testé, du dioxyde de carbone est produit au fur et à mesure que les microorganismes métabolisent les substrats dans le milieu de culture. Le CO<sub>2</sub> produit pendant la croissance bactérienne entraîne le virage du détecteur colorimétrique au fond de chaque flacon, d'une couleur foncée à une couleur plus claire.

Une diode électroluminescente(DEL) projette de la lumière sur le détecteur. La lumière réfléchiée est mesurée par un photodétecteur. La quantité de lumière réfléchiée est proportionnelle à la quantité de CO<sub>2</sub> produite.

## **2. Utilisation en routine**

### **2.1. Mise en route**

#### **2.1.1. Allumer l'appareil**

L'appareil BacT/ALERT 3D est une étuve qui doit rester en permanence en marche.

- Allumer d'abord le module combo droit (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT ALERT 3D).
- Allumer ensuite le module combo gauche (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT ALERT 3D).
- Allumer en fin le module de contrôle (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT ALERT 3D).

Pour l'onduleur : attendre que le voyant vert arrête de clignoter.

### **2.2. Réactifs**

Le BACT/ALERT utilise les flacons de culture à usage unique, auxquels sont ajoutés les échantillons à tester. Chaque flacon contient un détecteur de CO<sub>2</sub> qui sert d'indicateur de la croissance microbienne. Le flacon de culture BACT/ALERT 3D est prêt à l'emploi. Une date de péremption figure sur l'étiquette de chaque flacon. Ne pas utiliser les milieux après le dernier jour du mois indiqué. Si les flacons sont conservés réfrigérés, il peut se former un précipité qui disparaît lorsque les flacons sont portés à température ambiante (15-30°C).

Conserver le flacon à l'abri de la lumière et à température ambiante. Il existe 2 grands types de flacons :

Les flacons d'hémoculture (BC)

- Les flacons aérobies (FA) □ Le flacon anaérobie (FN)

**NB** : Utiliser uniquement les flacons aérobies chez les nourrissons (0-6 mois) ou flacon pédiatriques (FP)

## 2.2. Mode opératoire

### 2.2.1. Traitement de l'échantillon

### 2.2.2. Accès au clavier du module de contrôle

Il existe deux types de tiroirs à clavier, le modèle A et le modèle B Pour accéder au clavier du tiroir du **module A** :

- Tirer complètement le tiroir à clavier au bas du module de contrôle. Le tiroir révèle un couvercle comprenant une glissière pour la carte aide-mémoire.
- Saisir les côtés du couvercle au niveau de la façade du module de contrôle.
- Appuyer sur les languettes métalliques de chaque côté du tiroir pour le tirer complètement.
- Tirer complètement le tiroir et soulever le couvercle.
- Sortir le clavier, rabattre le couvercle et poser le clavier sur le plan de travail.

Pour accéder au clavier du tiroir du **module B**

- Tirer complètement le tiroir à clavier au bas du module de contrôle. Le tiroir révèle un couvercle comprenant une glissière pour la carte aide-mémoire.
- Saisir les côtés du couvercle près de soi.
- Appuyer sur les languettes métalliques de chaque côté du tiroir pour le tirer complètement.
- Soulever le couvercle à partir de l'avant pour accéder au clavier.
- Sortir le clavier, rabattre le couvercle et poser le clavier sur le plan de travail.

**Lorsque la saisie manuelle est terminée, le clavier peut être remplacé sous le couvercle. Fermer le tiroir en appuyant sur les deux languettes latérales tout en repoussant le tiroir.**

### 2.2.3. Chargement des flacons

- Appuyer le bouton **chargement des flacons** de l'écran principal. L'écran mode de chargement apparaît.
- S'assurer que le champ **ID de flacon** apparaît blanc, puis scanner ou entrer manuellement l'**ID du flacon**.
- S'assurer que le type de flacon approprié est affiché sur le bouton de défilement de **type de flacon**.
- Si le champ **numéro d'examen** est activé et vierge, passer à l'étape 5. Si le champ **numéro d'examen** est désactivé, passer à l'étape 7.
- S'assurer que le champ **numéro d'examen** est blanc puis scanner ou entrer manuellement le numéro d'examen.
- Si les champs sont affichés et activés, saisir manuellement les informations suivantes dans l'ordre indiquant : o Id d'hôpital. o Prénom du patient. o Nom du patient
- La durée maximale du test par défaut s'affiche au-dessus du bouton **modification de la durée maximale de test**.
- Si tous les tiroirs sont fermés, ouvrir lentement un tiroir comportant un voyant allumé. Les voyants des cellules disponibles sont allumés.

- Introduire le flacon (le détecteur colorimétrique en avant) dans une cellule avec un voyant allumé.
- Le voyant de la cellule clignote lentement pour indiquer que le flacon est chargé.
- Vérifier que tout le texte des champs s’efface avant de poursuivre.
- Répéter les étapes 2 à 11 pour chaque flacon restant. Les flacons peuvent être chargés dans le même tiroir jusqu’à ce que toutes les cellules disponibles soient remplies. A ce stade refermer délicatement le tiroir et ouvrir un autre tiroir comportant un voyant allumé.
- Lorsque tous les flacons sont chargés, vérifier que tous les tiroirs sont bien fermés, appuyer sur le bouton **valider**

#### 2.2.4. Déchargement des flacons

L’automate ACT/ALERT 3D indique les types de flacons prêts à être déchargés en activant le bouton **Déchargement** correspondant.

**NB** : Pour préserver l’intégrité des données de test, manipuler un seul flacon à la fois. Il importe de terminer la procédure pour chaque flacon avant de poursuivre avec le flacon suivant.

- Vérifier que les flacons à déchargés sont répertoriés dans le rapport de déchargement.
- Appuyer sur le bouton de **déchargement** approprié de l’écran principal. Cette action a pour but :

o de faire apparaître l’écran mode de déchargement. o d’allumer les voyants verts des tiroirs contenant des flacons du type de flacon à décharger sélectionné.

- Ouvrir le tiroir indiqué. Lorsque le tiroir indiqué est ouvert, les voyants des cellules s’allument à côté de tous les flacons de la catégorie sélectionnée.
- Sortir un des flacons indiqués. Le voyant de la cellule clignote lentement pour indiquer le déchargement du flacon.
- Si le flacon était identifié au chargement :

Note : L’ID du flacon, son type, le numéro d’examen, l’ID d’hôpital ainsi que le nom et prénom du patient s’affiche dans les champs des tests désactivés, de l’écran mode de

déchargement, le cas échéant, il n'est pas nécessaire de scanner de nouveau l'ID du flacon, cependant, cela permet d'en vérifier l'identité. Si les champs sont vierges ou doivent être modifié, utiliser alors la fonction d'édition des relations de données. (Menu de configuration. Taper : 1, 2, 3, 4, clé. Appuyer sur la touche « Edition des relations de données »)

- Si le flacon a été chargé anonymement (le champ **ID du flacon** est vierge), scanner ou saisir manuellement l'**ID du flacon**. Identifier le flacon en entrant l'ID du flacon, le type de flacon, le numéro d'examen, l'ID d'hôpital, ainsi que le nom et prénom du patient.
- Si le flacon doit être rechargé, le remettre immédiatement dans la cellule dont le voyant clignote lentement, avant de décharger un autre flacon.
- Répéter les étapes 3 à 5 pour les flacons restant à décharger.
- Après avoir effectué le déchargement des flacons, vérifier que tous les tiroirs sont bien fermés.
- Appuyer sur le bouton **valider** de l'écran mode de déchargement.

### **3. Gestion des flacons positifs non confirmés (faux positif)**

Si un étalement d'un flacon positif ne révèle pas la présence de microorganismes, le flacon doit être repiqué et recharger dans l'instrument au moyen de la fonction de chargement des flacons.

Un flacon rechargé dans l'instrument redevient négatif dès la première mesure (durée maximale 10 mn).

Si le repiquage donne lieu à une croissance bactérienne, faire passer l'état du flacon positif à partir de l'écran **Edition des résultats** de test, accessible dans l'écran **Edition de dossier** flacon et décharger le flacon à présent positif.

### **4. Résultats**

La positivité et la négativité des flacons de culture sont déterminées par un système de détection des mycobactéries et des hémocultures. Aucune intervention n'est nécessaire jusqu'à ce que l'instrument signale des flacons de culture positive ou négative.

En cas de positivité d'un flacon de culture, l'écran de l'appareil devient jaune et une alarme sonore se déclenche. En cas de négativité d'un flacon de culture, le bouton de déchargement de flacon négatif s'active.

Pour visualiser un résultat, il faut à partir de l'écran principal, cliquer sur le bouton afficher l'écran de rapport 2 (= génère un rapport tiré par numéro d'examen).

Pour imprimer le rapport, appuyer le bouton **imprimé** approprié :

- Toucher le bouton **imprimé le rapport** pour imprimer l'ensemble des enregistrements du rapport.
- Toucher le bouton **imprimer le groupe actuel** pour imprimer l'ensemble des enregistrements associées à ce groupe.

## 5. Procédure dégradée

Si l'appareil est indisponible, informer le biologiste qui prendra les dispositions nécessaires. Dans ce cas il nous sera possible de faire la culture en milieu solide.

Pour les messages d'erreur, se référer au classeur utilisateur pour la lecture des messages d'alarme

## 6. Visualisation de la courbe d'évolution bactérienne

A partir de l'écran principal :

- Appuyer sur l'icône  →
- Appuyer sur   , le Cardenas s'ouvre : la page est active.
- Appuyer sur la 3<sup>ème</sup> icône dans la 2<sup>ème</sup> colonne de l'écran affiché.
- Scanner le code barre de l'échantillon.
- Appuyer sur l'icône en bas à  droite et la courbe d'évolution s'affiche.

## 7. Gestion des réactifs et consommables

Se conférer à la notice contenue dans chaque lot.

**8. Gestion des documents**

Type de document	Contenant	Lieu	Durée de conservation
Document qualité	Classeur assurance qualité BACT/ALERT 3D	Labo	<b>3 ans</b> après la fin de leur utilisation
Traçabilité AQ	Fiche de vie BACT/ALERT 3D	Labo	Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après
Documentation Fabricant	-Manuel d'utilisation BACT/ALERT 3D -Manuel instrument BACT/ALERT 3D	Labo puis archives	Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après
Ticket machine patient	Classeur résultats	Labo puis archives	<b>1 an</b> + année en cours
Ticket machine CQI et rapport de cal.	Classeur CQI	Labo puis archives	<b>3 ans</b>



### Annexe N°3: MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	02/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	TZ	Visa :
Vérifié le :	25/03/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/04/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE		Visa :
Mise en application :	25/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	25/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

**Document provisoire**

**X Document opérationnel**

**Exemplaires :** - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

## **I – Buts**

Décrire le mode opératoire de la technique de coloration de Gram.

## **II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

## **III - Abréviations/Définitions**

**LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux**

## **IV – Références**

## **V – Contenu**

### **MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM**

#### **Principe**

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'une des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique de bactéries ;
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool-acétone.

#### **Matériel**

- Microscope ;
- Blouse ;
- Bac de coloration ;

- Plaque chauffante ;  Bec bunsen ;  Centrifugeuse.

### **Consommable**

- Gants ;
- Lames porte objet ;  Tube conique ;  Pipette pasteur.

### **Réactif**

- Colorants : violet de gentiane, le lugol, l'alcool-acétone, la fuchsine.
- L'huile d'immersion.

### **Nature du prélèvement**

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

### **Contrôle de qualité**

Les lames positives (frottis préparés avec une souche de bactérie connue) sont conservées et utilisées comme lames de référence

### **Technique**

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;
- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30secondes ;

- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ; □ Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

### **Résultat**

A la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet



#### Annexe N°4: MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

Rédigé le:	24/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	03/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	Visa :
Vérifié le :	22/04/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	22/04/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	22/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	22/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

### **I – Buts**

Décrire la technique du test de la catalase en microbiologie.

### **II - Domaines et personnels concernés**

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### **IV – Références**

### **V – Contenu**

## **MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE**

### **But :**

La recherche de la catalase est réalisée pour différencier le genre :

- *Streptococcus* (catalase négative) du genre *Staphylococcus* (catalase positive)
- *Bacillus* (catalase positive) du genre *Clostridium* (catalase négative)
- *Listeria* (catalase positive) et/ou *Corynebacterium* (catalase positive) du genre *Erysipelothrix* (catalase négative)

### **Principe**

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La présence de catalase est détectée chez les micro-organismes par une libération d'oxygène à partir d'eau oxygénée.

La présence d'un agent épaississant et d'un colorant facilitent l'observation du dégagement gazeux.

**Matériel**

- Le réactif de catalase
- La lame porte-objet ;
- Le bâtonnet ;
- La souche pure.

**Contrôle de qualité**

L'activité du réactif peut être testée vis à vis des souches suivantes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la catalase est positive
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la catalase est négative

**Réalisation du test**

Laisser les flacons revenir à température ambiante

- Test sur lame o Déposer sur la lame une goutte d'ID color catalase ; o Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ; o A l'aide d'un bâtonnet, bien triturer.
- Test direct sur le milieu de culture o Déposer une goutte d'ID color catalase directement sur la colonie.

**Résultat**

Le test doit être réalisé sur des colonies de 18 à 24 heures après incubation. Les colonies plus âgées pourraient perdre leur catalase et donner des faux négatifs. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles ;

Les entérobactéries sont toutes des bactéries catalase positive, à l'exception de *Shigella dysenterie* ; Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont en général, catalase positive telles que

*Pseudomonas, Acinetobacter...* ;

Quelques cocci à Gram positif son catalase positive comme les Staphylocoques.

### **Gestion des déchets**

Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune.



## Annexe N°5: MODE OPERATOIRE DU TEST DE LA COAGULASE

Rédigé le:	23/02/2013	Par : Doussou COULIBALY	DC	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/05/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/05/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	25/06/2016			Version N° 1
Date de revue :	25/05/2017			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

## **I – Buts**

Décrire la technique du test de la coagulase en microbiologie.

## **II - Domaines et personnels concernés**

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

## **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

## **IV – Références**

## **V – Contenu**

### **MODE OPERATOIRE DU TEST DE LA COAGULASE**

#### **Principe**

Le BBL Coagulase Plasma, Rabbit (Plasma de lapin pour test de la coagulase BBL) servent à déterminer qualitativement la pathogénicité des staphylocoques par la méthode directe en tube. Cette méthode consiste à mélanger une culture en bouillon de la veille ou des colonies prélevées sur une boîte de gélose non inhibitrice dans un tube de coagulase plasma réhydraté. Le tube est incubé à 37°C, la formation d'un caillot dans le plasma indique une production de coagulase.

#### **Matériel**

- Tube sec ;
- L'oeuse ;
- Souche pure ;
- Bec bunsen ;
- Portoir tube ; □ Etuve ; □ Chronomètre.

**Réactif**

Le coagulase Rabbit est un plasma de lapin lyophilisé contenant environ 0,85% de citrate de sodium et 0,85% de chlorure de sodium.

**Conservation du réactif**

Le BBL coagulase plasma, Rabbit non ouvert se conserve entre 2 – 8°C

Le Plasma reconstitué se conserve à 2 – 8°C jusqu'à 14jours, ou aliquoter et congeler immédiatement à – 20°C jusqu'à 30jours, ne pas recongeler une fois décongeler.

**Nature du prélèvement**

Les colonies pures sur une souche gélosé ou en bouillon

**Contrôle de qualité**

Les contrôles positifs et négatifs sont testés aux souches de références pour vérifier la conformité des performances du coagulase Plasma avec les spécifications.

Microorganisme	ATCC	Réaction
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Caillot dans le tube
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Absence de caillot dans le tube

**Réalisation du test**

- Préparation des réactifs
  - Réhydrater le BBL Coagulase Plasma en ajoutant de l'eau purifiée dans le flacon comme indiqué ci-dessous puis mélanger en retournant alternativement le flacon.

Volume de produit	Eau purifiée stérile	Nombre approximatif de test
3 ml	3 ml	6
15 ml	15 ml	30
25 ml	25 ml	50

- Réalisation du test de BBL Coagulase
    - A l'aide d'une micropipette de 1 ml, ajouter 0,5 ml de BBL Coagulase Plasma, Rabbit réhydraté à un tube à culture sur un portoir ;
    - Ajouter environ 0,05 ml de culture en bouillon de la veille du microorganisme à tester dans le tube de plasma. Il est également possible, à l'aide d'un enseigneur à anse plastique stérile, d'émulsifier complètement dans le tube de plasma 2 – 4 colonies prélevées sur une boîte de gélose ;
    - Mélanger doucement ;
    - Incuber au bain-marie ou à l'étuve à 37°C pendant 4heures ;
- O Examiner périodiquement les tubes en les inclinant doucement. Ne pas agiter le tube pour ne pas risquer de désagréger le caillot et par conséquent, d'entraîner des résultats de test douteux ou faussement négatifs. Tout degré de coagulation dans un délai de 3 – 4 heures doit être interprété comme un résultat positif. De nombreuses souches productrices d'enzymes ne coaguleront le plasma qu'au bout de 24heures d'incubation.

### **Résultat**

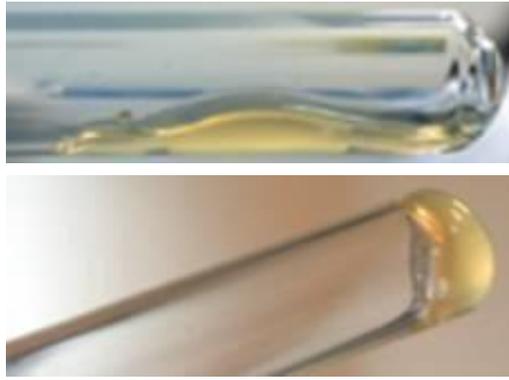
- Si la coagulase est négative : absence de formation de caillot, laisser jusqu'à 24heures sur la paillasse ;

- Si la coagulase est positive : le caillot ne se détache pas lorsque le tube est retourné.  
Suspicion de *Staphylococcus aureus*.

Aspect avant

Aspect du test positif

Aspect du test négatif



### Gestion des déchets

Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (contaminant).



### Annexe 6: MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE

Rédigé le:	20/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AL	Visa :
Vérifié le:	07/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	11/03/2005	Par : Faou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	23/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/04/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE		Visa :
Mise en application :	25/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	25/05/2018			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

**Document provisoire**

**X Document opérationnel**

**Exemplaires :** - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

**I – Buts**

Décrire la technique du test à l'Optochine en microbiologie.

**II - Domaines et personnels concernés**

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

**IV – Références V – Contenu****MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE****Principe**

Ce réactif permet de tester la sensibilité des streptocoques vis-vis de l'Optochine.

L'espèce *Streptococcus pneumoniae* est généralement sensible à l'Optochine contrairement aux autres streptocoques, en particulier les streptocoques alpha hémolytique.

**Matériel**

- Jarre ;
- Etuve bactériologique ;
- Disque d'Optochine.

**Conservation des disques**

- Les disques se conservent entre 2 – 8°C dans leur flacon jusqu'à la date de péremption;
- Conserver à l'abri de la lumière ;
- Après ouverture, les disques se conservent 3 mois à 2 – 8°C dans leur flacon.

**Nature du prélèvement**

Le test est réalisé à partir d'un ensemencement en culture pure d'une souche isolée de streptocoques.

### **Contrôle de qualité**

L'activité des disques peut être vérifiée sur gélose au sang frais avec la souche suivante :

*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Avec la zone d'inhibition après 24heures à 37°C :  
15 à 35mm.

### **Réalisation du test**

- Laisser le flacon de disques revenir à température ambiante ;
- A partir d'une ou plusieurs colonies de la souche à tester, ensemer en tries serrées une boîte de gélose au sang afin d'obtenir des colonies confluentes ;
- Déposer un disque d'Optochine à la surface de la boîte ensemencée ;
- Placer la boîte en atmosphère appropriée (enrichie en CO<sub>2</sub>) ;
- Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C pendant 24heures.

### **Résultat**

Lecture et interprétation

o Après incubation, observer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'Optochine : Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 15mm est une présomption de

*Streptococcus pneumoniae* ;

o L'identification du micro-organisme peut être poursuivie par des tests biochimiques et immunologiques, le Vitek 2 Compact, le mini Api.



## Annexe N°7: MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Sandrine	S	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:	25/03/2016	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	25/04/2016			Version N° 1
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

 Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le

serveur Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

P:

MO:

D:

E:

**I – Buts**

Décrire le mode d'utilisation du vitek 2 Compact.

**II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

**III- Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire

Rodolphe Mérieux

**IV – Références**

Manuel d'utilisation du Vitek 2 Compact

**V – Contenu**

**MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU VITEK  
2 COMPACT**

**Principe**

Le système Vitek 2 Compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.

Le logiciel fourni par le système Vitek 2 Compact inclut des programmes d'analyses, de gestion de données et un système de contrôle de qualité afin de valider le kit test du Vitek 2 Compact.

**Mode opératoire**

- Prendre le flacon eau saline Vitek 2, introduire la dispensette ;
- Prendre des tubes secs pour Vitek 2, y introduire dans les puits de la cassette ;
- La cassette peut prendre jusqu'à 10 tubes soit 2x5 (identification+ antibiogramme) ;
- Mettre dans chaque tube, 3ml de la solution saline du Vitek 2 à l'aide de la dispensette préalablement réglée à 3 ml.

**N.B : Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés** dont l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;
- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une oese, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien vortexer ;

- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à **0,5 McFarland** ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;
- Préparer la solution pour antibiogramme :
  - Si la bactérie à identifier est à :  
Gram positif, utiliser la micropipette calibrée à 280µl (bleue), Gram négatif, utiliser la micropipette calibrée à 145µl (rouge) ;
  - A partir de la suspension bactérienne, pipeter en fonction de la nature du germe suspecté  
(BGN ou BGP) et diluer dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin.  
On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.
- Placer la carte d'identification (soit GN, soit GP ou YST) et la carte pour l'antibiogramme (soit AST- N, soit SST- P ou AST- Y) en fonction de la nature du germe sur la cassette.

**NB**: différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
  - Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233
  - ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117
  - Levures : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-YS01, réf 22108
- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;
    - Cliquer sur Vitek 2
    - Mettre Identifiant : **labsuper**, le mot de passe : **labsuper**
    - Cliquer sur gérer la cassette virtuelle
    - Créer une cassette virtuelle
    - Identification de la cassette 1,2,...
    - Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette
    - Saisir les données de l'isolat ;

- Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)
- Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle
- Au niveau de l'automate Vitek 2 Compact,
- Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre ;
- Fermer le capot de remplissage ;
- Appuyer sur la touche **Lancer remplissage**, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;
- Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;
- Lorsque le message **retiré** s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le Vitek 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant **le capot chargement** puis le refermer ;
- On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

### **Résultats**

Le Vitek 2 Compact est un appareil qui permet d'identifier les germes et de réaliser l'antibiogramme puis d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle puis la sensibilité naturelle du germe.

Exemple : les bétalactamases des entérobactéries (*Klebsiella*, *E. coli*), *S.aureus* résistant à méthicilline et vancomycine, *Pseudomonas* résistant à l'imipénème...et les phénotypes des souches sauvages (le germe sensible à tous les antibiotiques testés excepté les sensibilités naturelles).

### **Gestion des déchets**

- **Retrait des cartes éjectées :**

Pour éjecter une carte, le Vitek 2 Compact la retire du carrousel/incubateur, la présente au lecteur de cartes et la dépose dans le récipient collecteur de déchets. Le réceptacle

collecteur de déchet peut contenir jusqu'à 60 cartes, il est recommandé de contrôler régulièrement le niveau du réceptacle collecteur de déchet et le vider.

- **Retrait du réceptacle collecteur de déchet :**
  - Ouvrir le capot du récipient collecteur de déchets. Noter que les cartes usagées sont stockées à l'intérieur du réceptacle ;
  - Retirer le réceptacle collecteur de déchet de la station de travail en tirant sur le bord avant, vers soi ;
  - Jeter les cartes usagées dans la poubelle de déchets contaminés ;
  - Remettre en place le réceptacle collecteur de déchets en le faisant glisser vers l'intérieur ;
  - Fermer le capot du récipient collecteur de déchets.

**Le Vitek 2 Compact réinitialise le compteur de déchets si le réceptacle est entièrement vidé.**

## **SERMENT DE GALIEN**

**Je jure en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;**

**D'exercer avec conscience ma profession, dans l'intérêt de la santé publique, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;**

**D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;**

**En aucun cas, de ne consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle mes promesses,**

**Que je sois méprisé par mes confrères si je manquais à mes engagements.**

**Je le jure.**