



UNIVERSITE DES SCIENCES, DES  
TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE  
BAMAKO

*Faculté de Pharmacie*



**FAPH**

Année Universitaire 2018-2019

N° .....

**THESE**

---

**Sensibilité aux antibiotiques usuels des souches  
de *Streptococcus pneumoniae* isolées dans les  
expectorations au laboratoire de bactériologie  
de l'INRSP à Bamako.**

---

Présentée et soutenue publiquement le ...../...../2019  
Devant le jury de la faculté de pharmacie

Par

**Mme Houssenatou Maiga**

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie  
(DIPLOME D'ETAT)

---

**JURY**

Président : Pr Sounkalo DAO  
Membre : Dr Yacouba Cissoko  
Membre : Dr Abdelaye Keita  
Co-directeur: Dr Ibréhima Guindo  
Directeur: Pr Flabou Bougoudogo

**Au nom de Dieu, le Clément, le Miséricordieux.**

Dis : IL est Dieu, Unique

Dieu, le seul à être imploré pour ceux que nous désirons

IL n'a jamais engendré, n'a pas été engendré non plus

Et nul n'est égal à lui :(Sourate 112 ; 4 versets 1, 2, 3,4)

Egalement au dernier des Prophètes, l'Ami d'ALLAH, Salut et Paix sur toi Muhamad.

## **Je dédie cette thèse .....**

### **A mon très cher et adorable père Oumar Dabori**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien être. Tu as été pour moi durant toute ma vie le père exemplaire, l'ami et le conseiller. Tes prières ont été pour moi d'un grand soutien au cours de ce long parcours. J'espère réaliser ce jour un de tes rêves et être digne de ton nom, ton éducation, ta confiance et des hautes valeurs que tu m'as inculquées. Que Dieu, tout puissant, te garde, te procure santé, bonheur et longue vie pour que tu demeures le flambeau illuminant mon chemin.

### **A ma très chère et précieuse mère Mariam Boncana Touré**

Je ne saurais jamais exprimer ma gratitude envers ce que vous m'avez offert par amour inconditionnellement.

Femme sobre, généreuse, vertueuse au foyer. Vous êtes la lueur qui me guide dans la vie, sans vous je n'arriverais jamais à ce jour.

A mon premier amour, celle qui était toujours près de moi, qui avait toujours confiance en moi, qui a souffert pour que je sois heureuse, qui oubliait ses maux pour soulager les miens. Ce travail a vu le jour grâce à votre patience, à votre amour pur, à votre tendresse, à vos sacrifices, et à votre cœur vaste qui a pu me soutenir et m'aimer inconditionnellement.

Vous êtes le plus beau cadeau que mon Bon Dieu m'a offert.

Vous saviez toujours me réconforter par vos mots qui me sont précieux.

Votre fierté aujourd'hui est le véritable prix qui couronnerait ma tête.

Que Dieu vous protège et vous prête bonne santé.

### **A ma belle-famille : La famille Sangaré**

Particulièrement mon mari Mamadou Sangaré pour ton aide ton affection, ta compréhension, tes encouragements et ton amour sans faille

Les mots pour te remercier n'existent dans aucune langue

A chaque ligne de cette thèse j'ai pensé à toi

Que dieu nous donne longue vie avec succès et bonheur

Merci d'être à mes coté dans chaque épreuve de la vie, trouve ici l'expression de mon profond amour et de mon éternelle reconnaissance.

### **A mes deux filles jumelles : Assétou et Mariam Sangaré,**

Votre venue au monde est la plus belle chose qui me soit arrivée. Pour votre éducation desquelles je m'impliquerai avec constance autant que ma mère l'a fait et le fait encore pour moi. Dieu vous prête santé et longévité. Je vous aime de tout mon cœur.

**A mes frères et sœurs : Abdoulaye, Abdourhamane, Seydou, Alassane, Mohamed, Alassane Moussa, Hassinatou, Fadimata et Aminata,**

Que l'entente et l'affection soient toujours présentes dans nos relations. N'oublions jamais les efforts fournis par nos parents pour parfaire notre éducation et que l'unité familiale soit notre but. Puisse ce travail vous servir d'exemple. Trouvez ici l'expression de ma plus grande sympathie.

**A la mémoire de mes grands-parents maternels et paternels, mes tantes, et mes oncles,** en votre mémoire, je vous dédie ce travail. Puisse DIEU vous accueillir en paix.

## **Remerciement...**

Au terme de cette étude, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Principalement :

**A toute l'équipe de Bactériologie-virologie de l'INRSP, Dr Ibrehima Guindo, Dr Mahamadou Abdou, Mme Traoré Hawa Samaké, Mr Marcel Koné, Dr Fatoumata Diallo, Dr Alhadji A Dicko,**

Pour m'avoir accueilli les bras ouverts dans votre service et pour n'avoir ménagé aucun effort pour l'aboutissement de ce travail. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

**A ma très chère sœur Hassi**

Pour le soutien et les encouragements dont tu as fait preuve tout au long de ce travail. Pour avoir supporté mon angoisse, mes baisses de moral et avoir toujours su trouver les mots justes pour m'encourager. Trouves dans ces quelques lignes la preuve de tout mon amour.

**Tous mes camarades thésards des aînés au cadet en passant par les promotionnaires,**

Pour le soutien et les encouragements incontestables dont vous avez fait preuve tout au long de ce travail

**Toute la 9<sup>ème</sup> promotion du numéris clausus.**

Pour les six belles années que l'on a passées ensemble. Trouvez ici l'expression de mon sincère attachement.

**A tous mes maîtres de l'enseignement primaire, secondaire et universitaire** qui m'ont transmis leurs savoirs et leurs connaissances pendant mon parcours scolaire et universitaire.

**A mes amis (es)** pour leur sympathie.

**A mes nièces et neveux** en témoignage d'une longue vie.

**A mes camarades de la FMPOS**

**A mes voisins pour leur relation de bon voisinage.**

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

A tous ceux qui ont pour mission cette pénible tâche de soulager l'être humain et de lui procurer le bien-être physique, psychique et social

## **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

**A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DU JURY**

**PROFESSEUR SOUNKALO DAO**

- **PROFESSEUR DES MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES**
- **CHERCHEUR AU CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION SUR LA TUBERCULOSE ET LE VIH ;**
- **PRÉSIDENT DE LA SOCIÉTÉ MALIENNE DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE ET TROPICALE**
- **MEMBRE DE LA SOCIÉTÉ AFRICAINE DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE**
- **MEMBRE DE LA SOCIÉTÉ DE PATHOLOGIE INFECTIEUSE DE LA LANGUE FRANÇAISE**
- **MEMBRE DU COLLEGE OUEST AFRICAIN DES MEDECINS**
- **CHEF DE SERVICE DE MALADIES INFECTIEUSES DU CHU DU POINT G.**

CHER MAÎTRE, C'EST UN GRAND HONNEUR QUE VOUS NOUS FAITES EN ACCEPTANT DE PRÉSIDER CE JURY DE THÈSE MALGRÉ VOS MULTIPLES ET IMPORTANTES OCCUPATIONS.

VOS QUALITÉS HUMAINES, VOTRE ABORD FACILE FONT DE VOUS UN HOMME ADMIRABLE. LA SPONTANÉITÉ AVEC LAQUELLE VOUS AVEZ ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL, MONTRE VOTRE DISPONIBILITÉ POUR VOS ÉTUDIANTS ET VOTRE SIMPLICITÉ.

RECEVEZ CHER MAÎTRE, NOS SINCÈRES REMERCIEMENTS.

**A NOTRE MAÎTRE ET JUGE**

**DOCTEUR YACOUBA CISSOKO**

- **SPÉCIALISTE DES MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES**
- **TITULAIRE D'UN MASTER EN IMMUNOLOGIE ET INFECTION**
- **PRATICIEN AU CHU POINT G**
- **MAITRE-ASSISTANT À LA FMOS**
- **SECRÉTAIRE GÉNÉRAL DE LA SOMAPIT.**

CHER MAITRE, NOUS SOMMES TRÈS TOUCHÉS PAR L'INTÉRÊT QUE VOUS AVEZ PORTÉ À CE TRAVAIL MAIS AUSSI PAR LA SPONTANÉITÉ AVEC LAQUELLE VOUS AVEZ ACCEPTÉ DE LE JUGER. NOUS SOMMES FIERS D'AVOIR BÉNÉFICIÉ DE VOTRE FORMATION.

TROUVEZ ICI CHER MAÎTRE L'EXPRESSION DE NOTRE ATTACHEMENT ET DE NOTRE GRATITUDE.

**A NOTRE MAÎTRE ET JUGE**

**DOCTEUR ABDELAYE KEITA**

- **TITULAIRE D'UN PHD EN RECHERCHE CLINIQUE ET INNOVATION TECHNOLOGIQUE  
OPTION BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE;**
- **CHARGÉ DE RECHERCHE À L'INRSP.**

VOUS NOUS AVEZ PROFONDÉMENT MARQUÉ PAR VOTRE PERSONNALITÉ HUMBLE, VOTRE SIMPLICITÉ, VOTRE HUMANISME ET SURTOUT VOTRE DISPONIBILITÉ CONSTANTE. MERCI DE NOUS AVOIR ACCORDÉ UNE PARTIE DE VOTRE TEMPS ET CELA MALGRÉ VOS MULTIPLES OCCUPATIONS.

**A NOTRE MAÎTRE ET CO-DIRECTEUR**

**DOCTEUR IBREHIMA GUINDO**

- **PHARMACIEN BIOLOGISTE,**
- **CHEF DE SERVICE DU LABORATOIRE DE BACTÉRIOLOGIE-VIROLOGIE À L'INRSP**
- **MAÎTRE-ASSISTANT DE BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE À LA FACULTÉ DE PHARMACIE(FAPH).**
- **POINT FOCAL DE LUTTE CONTRE LA RAM.**

CHER MAÎTRE, VOUS NOUS AVEZ FAIT L'HONNEUR DE NOUS CONFIER CE SUJET DE THÈSE. LES MOTS NE SERONT JAMAIS ASSEZ FORTS POUR EXPRIMER AVEC EXACTITUDE LA PROFONDE ADMIRATION QUE NOUS AVONS À VOTRE ÉGARD DE PAR VOS IMMENSES QUALITÉS SCIENTIFIQUES, VOTRE SIMPLICITÉ ET DISPONIBILITÉ PERMANENTE; NOUS VOUS REMERCIONS POUR VOS CONSEILS ET VOTRE RIGUEUR DANS L'ENCADREMENT DES ÉTUDIANTS QUI NOUS ONT RENDUS BIEN MEILLEURE QUE NOUS L'AVIONS ÉTÉ. QUE LE TOUT PUISSANT VOUS ACCORDE UNE LONGUE ET BRILLANTE CARRIÈRE.

**A NOTRE MAÎTRE ET DIRECTEUR DE THÈSE**

**PROFESSEUR FLABOU BOUGOUDO GO**

- **PHARMACIEN MICROBIOLOGISTE**
- **MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ EN BACTÉRIOLOGIE ET VIROLOGIE À LA FACULTÉ DE PHARMACIE**
- **DIRECTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE EN SANTÉ PUBLIQUE (2005-2012)**
- **OFFICIER DE L'ORDRE DU MÉRITE DE LA SANTÉ.**

CHER MAÎTRE, C'EST UN GRAND HONNEUR, QUE VOUS NOUS AVEZ FAIT EN NOUS CONFIAINT CE TRAVAIL.

NOUS GARDERONS DE VOUS LE SOUVENIR D'UN EXCELLENT MAÎTRE, D'UN PROFESSEUR DIGNE DE RESPECT ET DE CONSIDÉRATION.

VEUILLEZ ACCEPTER, L'EXPRESSION DE NOTRE GRATITUDE, TOUT EN VOUS REMERCIANT DE VOTRE DISPONIBILITÉ ET DE VOTRE GÉNÉROSITÉ.

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect en coloration de Gram du <i>S. pneumoniae</i> (24). .....	8
Figure 2 : Aspect du Pneumocoque sur une gélose au sang incubé en atmosphère enrichie en CO <sub>2</sub> .....	9
Figure 3 : Structure de la paroi de <i>S. pneumoniae</i> (31). .....	12
Figure 4 : Mécanismes physiopathologiques du pneumocoque (31). .....	14
Figure 5 : Classification des antibiotiques selon le mode d'action Référence .....	16
Figure 6 : Zone d'hémolyse partielle (alpha) donnant à la gélose une couleur verdâtre (décoloration verte autour des colonies) .....	29
Figure 7 : Identification du pneumocoque avec un disque d'optochine ( zone d'inhibition créée par la pose d'un disque d'optochine ). .....	30
Figure 8 : Répartition des patients selon le sexe. ....	37
Figure 9 : Répartition des patients selon l'âge. ....	38
Figure 10 : Sensibilité et résistance des souches de pneumocoque aux antibiotiques. ....	43

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b> : Répartition des germes isolés après culture les .....	37
<b>Tableau II</b> : Répartition des patients selon leur provenance. ....	38
<b>Tableau III</b> : Répartition des prélèvements en fonction du mois.....	39
<b>Tableau IV</b> : Répartition des patients selon leur profession. ....	39
<b>Tableau V</b> : Répartition des patients en fonction du traitement reçu avant l'examen. ....	40
<b>Tableau VI</b> : Profil antibiotique des souches de Streptococcus.....	39
<b>Tableau VII</b> : Profil de résistance aux antibiotiques des souches.....	40
<b>Tableau VIII</b> : Classification des différents phénotypes. ....	41
<b>Tableau IX</b> : Classification des souches selon le type de résistance.....	42

## **Sigles et Abréviations**

<b>%</b>	Pourcentage
<b>° C</b>	Degré Celsius
<b>°</b>	Degré
<b>ADN</b>	Acide desocytiribonucleique
<b>Ag</b>	Antigène
<b>AMP</b>	Ampicilline
<b>AMX</b>	Amoxicilline
<b>ANC</b>	Acide nalidiscique colistine
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide ribonucleique de transfert
<b>AST</b>	Test de sensibilité aux antibiotiques
<b>BHM</b>	Barriere hemato meningée Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de
<b>CA-SFM</b>	Microbiologie
<b>CbpA</b>	Choline binding proteine A
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CNRP</b>	Centre National de Référence des Pneumocoques
<b>CO2</b>	Dioxyde de carbone
<b>CRO</b>	Ceftriaxone
<b>DHPS</b>	Dihydropteroate synthétase
<b>EF-G</b>	Facteur d'élargation G
<b>ERY</b>	Erythromycine
<b>GBS</b>	Streptocoque groupe B
<b>H2O2</b>	Eau oxygénée
<b>ID</b>	Identifier
<b>IgA</b>	Immunoglobuline A
<b>INRSP</b>	Institut National de Recherche en Sante Publique
<b>LCS</b>	Liquide cérébro-spinal
<b>MCS</b>	Méningite Cérébro-spinale
<b>MDR</b>	Multiple-drug-résistance
<b>MDSC</b>	Multi disease surveillance centre

<b>MI</b>	Millilitre
<b>MLS</b>	Macrolide-lincosamides-streptogramines
<b>mm</b>	Millimètre
<b>NanA</b>	Neuraminidase A
<b>Ng</b>	Non groupable
<b>OMA</b>	Otite moyenne aigue
<b>OMS</b>	Organisation mondial de la sante
<b>OR1</b>	Oraux 1
<b>OR3</b>	Oraux3
<b>OR4</b>	Oraux4
<b>OR5</b>	Oraux5
<b>OR6</b>	Oraux6
<b>ORL</b>	Oto-rhino laryngologie
<b>OXA</b>	Oxacilline
<b>PAF</b>	Plaquette activating factor
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Réaction
<b>PEN</b>	Pénicilline
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>PLP</b>	Proteine liant la pénicilline
<b>PME</b>	Protéine de Membrane Externe
<b>PPV23</b>	Vaccins polysaccharidiques pneumococciques 23- valent
<b>PRI</b>	Pristinamycine
<b>Psa-A</b>	L'adhesine A de surface des pneumocoques
<b>PspA</b>	Protéine A de surface des pneumocoques
<b>PspC</b>	Protéine C de surface des pneumocoques
<b>PVC</b>	Vaccins antipneumococciques
<b>QSP</b>	Quantité suffisante pour
<b>S</b>	Smooth
<b>S p</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>S /unite</b>	Sous unite
<b>S.mitis</b>	Streptococcus mitis
<b>S.oralis</b>	Streptococcus oralis
<b>S.P.V</b>	Supplément Polyvitaminé

<b>S.pneumoniae</b>	Streptococcus pneumoniae
<b>S.pyogene</b>	Streptococcus pyogene
<b>SDR</b>	Specificdrug-résistance
<b>SDS-PAGE</b>	Dodecyl Sulfate de Sodium-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>SSS</b>	Substance spécifique soluble
<b>ST</b>	Séquence-type
<b>TET</b>	Tétracycline
<b>T-I</b>	Trans Isolate
<b>UI</b>	Unité Internationale
<b>VAN</b>	Vancomycine
<b>X</b>	Facteur 10
<b><math>\alpha</math></b>	Alpha
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramme

## Table des Matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>OBJECTIFS</b> .....	3
<b>I. GENERALITES</b> .....	4
I.1. Généralités sur le Pneumocoque .....	4
I.1.1. Définition.....	4
I.1.2. Historique .....	4
I.1.3. Taxonomie et Habitat .....	5
I.1.4. Epidémiologie .....	6
I.1.5. Caractères bactériologiques.....	7
I.1.5.1. Morphologie .....	7
I.1.5.2. Caractères cultureux .....	8
I.1.5.3. Caractères Biochimiques .....	9
I.1.5.4. Caractères antigéniques .....	10
I.1.5.5. Facteurs de virulence.....	10
I.1.6. Physiopathologie et Immunologie.....	13
I.1.6.1. Colonisation des muqueuses respiratoires.....	13
I.1.6.2. Etape de bactériémie.....	13
I.1.6.3. Traversée de la BHM.....	13
I.1.7. Pouvoir pathogène .....	15
I.1.8. Diagnostic bactériologique.....	15
I.2. Généralités sur les antibiotiques.....	15
I.2.1. Définition.....	15
I.2.2. Classification et mécanisme d'action .....	16
I.2.2.1. Les Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires .....	17
I.2.2.2. Les Inhibiteurs de la synthèse des protéines.....	17
I.2.2.3. Les Inhibiteurs des acides nucléiques.....	17
I.2.2.4. Inhibiteurs de la synthèse des folates .....	17
I.2.3. Résistance aux antibiotiques.....	18
I.2.3.1. Définition.....	18
I.2.3.2. Mécanisme de résistance .....	18
I.2.3.3. Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques .....	20
I.2.4. Prophylaxie.....	21
<b>II. Matériel et Méthodes</b> .....	22

II.1.1.	Méthodes .....	22
II.1.1.1.	Cadre d'étude .....	22
II.1.1.2.	Type d'étude.....	23
II.1.1.3.	Période d'étude.....	23
II.1.1.4.	Population d'étude.....	23
II.1.1.5.	Collecte des données .....	23
II.1.2.	Matériel .....	23
II.1.2.1.	Matériel de laboratoire .....	23
I.1.1.1.	Matériel biologique .....	23
I.1.1.1.	Critères d'inclusion .....	23
I.1.1.2.	Critères de non-inclusion.....	24
I.1.2.	Méthodes Expérimentale.....	24
I.1.2.1.	Prélèvement .....	24
I.1.2.1.1	Techniques et méthodes de prélèvement du crachat .....	24
I.1.2.2.	Examen directe.....	25
I.1.2.3.	Coloration de Gram .....	26
I.1.2.4.	Culture.....	27
I.1.2.5.	Identification .....	27
I.1.2.6.	Antibiogramme.....	30
I-1.2.7	Pneumocoque de sensibilité diminuée aux pénicillines.....	33
I-1.2.8	Technique du D-Test .....	35
I.1.3.	Traitement et analyse des donnes .....	35
I.1.4.	Considération éthique.....	35
RESULTATS .....		37
COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....		44
Recommandations .....		48
BIBLIOGRAPHIE .....		49

## INTRODUCTION

Les infections à *pneumocoques* sont dues à une bactérie appelée *Streptococcus pneumoniae*. C'est une bactérie commensale du rhinopharynx de l'homme hautement recombinate. Les pneumocoques peuvent être responsables d'infections dans de nombreuses localisations du corps : l'oreille moyenne (otite) chez les enfants, les sinus (sinusite) chez l'adulte, les enveloppes du cerveau (méningite), le sang (bactériémie) et les poumons (pneumonie) (1).

*S. pneumoniae* est le principal agent étiologique des pneumonies aiguës communautaires, quel que soit l'âge, des méningites et des otites moyennes aiguës chez les enfants de moins de 2 ans. Il est particulièrement redoutable chez les sujets immunodéprimés (splénectomisés, alcoolo-tabagiques, patients infectés par le VIH), responsables chaque année de 15 millions de cas d'infections invasives dans le monde. La mortalité due aux infections à pneumocoque est élevée, de 15% à 30% dans les cas de pneumonies graves et de méningite. Il constitue, à travers le monde, un problème de santé publique (2).

Ces infections à *pneumocoques* sont dites invasives lorsque les pneumocoques diffusent dans un site normalement stérile tel que le sang (bactériémie ou septicémie), les méninges (méningites) ou une articulation (arthrite). De telles infections peuvent être graves et nécessitent le plus souvent une hospitalisation.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) les infections à *pneumocoques* constituent une cause majeure de morbidité et de mortalité partout dans le monde malgré l'existence d'antibiotiques efficaces et de vaccins. Plus de 800 000 enfants de moins de 5 ans meurent chaque année des suites d'une infection due aux pneumocoques dans le monde.

L'ampleur est présumée être à son maximum dans les pays en voie de développement, mais les données sur l'épidémiologie des infections à streptocoque ne sont pas complètement élucidées dans beaucoup de régions pauvres du monde.

L'antibiorésistance, qui est apparue comme phénomène alarmant à la fin des années 70 en Afrique du Sud, est désormais répandue dans le monde entier. Elle est favorisée par l'utilisation large et parfois inappropriée des antibiotiques, tout particulièrement des bêta-lactamines. Les pneumocoques résistants à la pénicilline sont souvent aussi moins sensibles aux céphalosporines, aux macrolides, au cotrimoxazole et au chloramphénicol. La prévalence de pneumocoques présentant une sensibilité diminuée à la pénicilline varie considérablement d'un pays à l'autre.

L'émergence de souches de *Streptococcus pneumoniae* de sensibilité diminuée à la Pénicilline G et multi résistantes justifient la mise en place d'un système de surveillance épidémiologique

du pneumocoque et la généralisation de la vaccination antipneumococcique dans le but de diminuer le portage et la transmission des souches multi résistantes.

Compte-tenu du développement des résistances aux antibiotiques, et de la menace d'impasse thérapeutique qu'elles représentent pour la santé publique, cette étude se propose d'établir un état des lieux des données disponibles concernant le profil de sensibilité des souches de pneumocoque en circulation en terme de fréquence, de sensibilité aux d'antibiotiques usuels au Mali.

## **OBJECTIFS**

### **1. Objectif général**

Etudier le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. pneumoniae* isolées dans les prélèvements d'expectoration dans le service de bactériologie de l'INRSP.

### **2. Objectifs spécifiques**

- Décrire les caractéristiques sociodémographiques des patients dont les expectorations ont permis d'isoler *S. pneumoniae* au laboratoire de bactériologie de l'INRSP.
- Déterminer la fréquence d'isolement du *S. pneumoniae* à partir des prélèvements d'expectoration reçus au laboratoire de l'INRSP à Bamako.
- Décrire le profil de sensibilité aux antibiotiques usuels des souches de *S. pneumoniae* isolées.

## I. GENERALITES

### I.1. Généralités sur le Pneumocoque

#### I.1.1. Définition

Les pneumocoques sont des bactéries à Gram positif disposées en paire (diplocoques) ou en courtes chainettes. Ils se distinguent des *Streptocoques* essentiellement par la présence d'une capsule polysaccharidique spécifique de type (Phase S : *Smooth*). La perte de la capsule (phase R : *rough*) leur ôte toute virulence et les rend indistinguable des Streptocoques. Ils sont responsables des infections broncho-pulmonaires et oto-rhino-laryngologiques, susceptibles de se compliquer en méningite ou en septicémie (3).

Comme tous les cocci à Gram positif, le *S. pneumoniae* est naturellement résistant au pénicilline, à l'aztréonam, aux quinolones (sauf fluoroquinolones anti-pneumococciques) et à la colistine.

Comme toutes les bactéries du genre *Streptococcus*, *S. Pneumoniae* présente une résistance à bas niveau aux aminosides.

#### I.1.2. Historique

Le nom *Streptococcus* (streptus, flexible ; coccus, grain) fut, pour la première fois, attribué par Biltroth et Ehrlich (1877) à des coques formant des chaînettes observées dans les blessures infectées. Fehleisen (1883) décrivit une coque similaire comme agent de l'érysipèle. Rosenbach (1884) donna le nom de *Streptococcus pyogenes* à des coques groupées en chaînettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme. Les chercheurs français Pasteur (1822-1895), Roux (1853-1933) et Chamberland (1851-1908), en 1881 rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez des lapins inoculés avec de la salive humaine. Cette expérience est considérée comme la première référence sur *Streptococcus pneumoniae*. La description de cette espèce fut réalisée par Fränkel et Weichselbaum (1886)(4).

L'évolution des connaissances concernant ses caractères bactériologiques et taxonomiques a fait varier au fil du temps ses dénominations : «*Micrococcus pasteurii* » (Sternberg, 1885), «*Micrococcus pneumoniae* » (Klein 1884), puis «*Diplococcus pneumoniae*» et «*Streptococcus pneumoniae*» (Chester 1901) (5).

Isolé de la salive en 1880 par Pasteur, le *Streptococcus pneumoniae* occupe la première place parmi les causes de mortalité par maladies infectieuses dans les pays développés. La découverte en 1910 des différents types sérologiques de *Streptococcus pneumoniae* avait permis l'emploi d'antisérums spécifiques qui furent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque (6).

En 1917, les travaux de Dochey et d'Avery ont conduit au diagnostic immunologique des infections à pneumocoque et à l'introduction de la contre immunoélectrophorèse pour la mise en évidence d'exo antigène polysaccharidique.

La sérothérapie qui était introduite par Cooper, a été abandonnée grâce à l'apparition des sulfamides, puis des antibiotiques (antibiotiques efficaces : cyclines, chloramphénicol, pénicillines) et de nouveaux vaccins polysaccharidiques.

Le rôle de la capsule dans la virulence de la bactérie a été démontré par l'anglais Griffith (1879-1941) en 1928 (5).

Sherman établit la première classification complète des streptocoques en 1937 (7).

L'étude de la physiologie de cette bactérie a conduit à des découvertes capitales qui ont ouvert la voie à la biologie moléculaire. En 1928, Griffith a montré qu'une souche R (rough) non capsulée et non pathogène pour la souris de *Streptococcus pneumoniae* pouvait être transformée en une souche S (Smooth) capsulée et pathogène. C'est ainsi que dans les années 40 (1944) les trois chercheurs Avery (1877-1955), MacLeod (1909-1972) et MacCarthy (1911-2005) établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques (6). Landefeld décrivit en 1933 les groupes sérologiques de A à F (8).

Parmi les groupes antigéniques que Landefeld désigne par des lettres (de A à H, et de K à V), les groupes A, B, C ou G caractérisent les espèces de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques les plus pathogènes. Les streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques ou non hémolytiques appartiennent à d'autres groupes ou sont non groupables et sont habituellement commensaux (5).

En raison de son important pouvoir pathogène pour l'homme, le *Streptococcus pneumoniae* a fait l'objet de nombreux travaux depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle.

L'étude de cette bactérie a permis de nombreuses découvertes concernant les mécanismes de pathogénicité, la réponse immunitaire à médiation humorale et les transferts génétiques (5).

En France, les premières souches de sensibilité diminuée à la pénicilline G sont apparues en 1979 et la surveillance a été assurée de 1984 à 1997 par le Centre national de référence des pneumocoques sous la direction de Pierre Geslin.

La première souche de *Streptococcus pneumoniae* résistante à la pénicilline a été découverte en 1987 au Mali(9).

### **I.1.3. Taxonomie et Habitat**

*S. pneumoniae* appartient à la famille des *Streptococcaceae*, du genre *Streptococcus*.

Ce genre comprend actuellement 44 espèces et sous-espèces, regroupées en trois ensembles : pyogènes, oraux et du groupe D (10).

*S. pneumoniae* est inclus dans l'ensemble des *streptocoques oraux*, mais reste dans le Bergey's manual<sup>®</sup> of Systematic Bacteriology, édition 1986, parmi les *streptocoques pyogènes* pour son pouvoir pathogène . Sur des critères de pathogénicité et d'identification pratique, les *streptocoques oraux* sont regroupés en cinq sous-ensembles (or1, or3 à or6). Le *S. pneumoniae* constitue à lui seul le sous-ensemble or3 (11).

Cependant, l'analyse génomique, notamment celle des séquences des acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux, montre une étroite similitude entre *S. pneumoniae* et les espèces *S. mitis* et *S. oralis*.

Ces trois espèces sembleraient capables d'échanger entre elles des fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN) formant ainsi une mosaïque complexe, plutôt que trois espèces séparées (12, 13).

C'est un germe commensal de la bouche et du rhinopharynx .Il n'est pas retrouvé dans le milieu extérieur (14).

- 1) Souches  $\alpha$ - ou non-hémolytiques, animales, groupe C
- 2) Souches  $\beta$ -hémolytiques, humaines ou animales, groupes C, G, ou L, rarement A
- 3) Souches  $\alpha$ - ou  $\beta$ -hémolytiques, groupes A, C, G, F ou non groupables
- 4) Souches habituellement  $\alpha$ -hémolytiques et non groupables

#### **I.1.4. Epidémiologie**

Cosmopolite, le pneumocoque l'est au sens strict puisque responsable de nombreux décès dans chaque pays, avec une attention toute particulière en Afrique et aux Etats- Unis ; dans ce dernier pays, il demeure la première cause de décès par maladie infectieuse. A l'échelon de l'individu, il atteint électivement les voies respiratoires inférieures et supérieures, avec une éventuelle diffusion ORL ou méningée et possible dissémination sanguine (15).

La majorité des infections surviennent dans l'enfance avant l'apparition de l'immunité naturelle résultant du portage. Cependant, la diversité des sérotypes capsulaires explique la possibilité de multiples infections chez un même individu (immunité de sérotype) (16).

En 2007, le centre national de pneumocoque de France déclare qu'entre 2005 et 2006 l'incidence des infections invasives à pneumocoque est de même niveau chez les enfants de moins de 2 ans (17).

Actuellement les PSDP (Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline) posent un problème à l'échelle mondiale puisque presque tous les pays ont connu une augmentation des souches de PSDP. Certains pays, sont plus concernés que d'autres du fait de la grande variation du taux des SPDP. La distribution des résistances varie en fonction des pays, des

régions et même en fonction des groupes de population, du site de prélèvement et en fonction de l'âge avec une prévalence élevée chez le jeune enfant (17).

1967 en Australie, premier cas mondial publié de sensibilité anormale à la pénicilline d'une souche invasive.

1973 en Espagne, première souche de PSDP (Pneumocoque de sensibilité diminuée à la pénicilline).

1974 aux USA, premier cas de résistance à la pénicilline d'une méningite pneumococcique.

1977 en Afrique du Sud, description de la première souche multirésistante.

1979 en France, première description de souche multirésistante.

1994 au Maroc, BENOUDA rapporte un taux de 10% de PSDP.

➤ **En Europe :**

Selon les données du réseau de surveillance européen EARSS, le pourcentage de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline G (PSDP) était le plus élevé en France (53 %), devant la Roumanie (50 %), Israël (38 %), l'Espagne (33 %) et la Pologne (30 %). En revanche, ce pourcentage était inférieur à 5 % en Autriche, Danemark, Allemagne, Hollande. Le pourcentage de pneumocoques résistants aux macrolides était aussi particulièrement élevé en France (58 %), juste derrière la Pologne (67 %) et devant la Belgique (34 %) et l'Italie (32 %) (18).

La consommation d'antibiotiques pourrait expliquer cette hétérogénéité au sein de l'Europe. Ainsi, la France et l'Espagne sont un des plus gros consommateurs d'antibiotiques en Europe. A l'inverse, une restriction de l'usage des antibiotiques a permis de faire diminuer le taux de PSDP, en Islande, qui avait brusquement augmenté de 1988 à 1993 (19).

➤ **Aux États-Unis :**

Aux États-Unis, il existe une augmentation progressive du taux de souches résistantes à la pénicilline G : En 1992, 5,6% des souches étaient résistantes à la pénicilline G, en 1997 18,6% et 34,6% en 2000 (20). On assiste dans un même temps à une augmentation des souches multi-résistantes : 1995 (9,1%) ; 1998 (16%) ; 24.4% en 2003 (21).

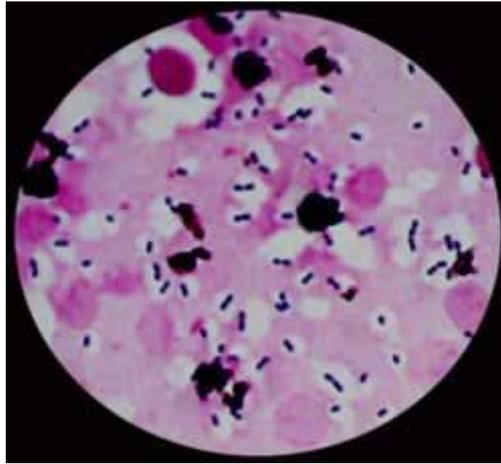
## **I.1.5. Caractères bactériologiques**

### **I.1.5.1. Morphologie**

Le *pneumocoque* se présente dans le liquide pathologique sous forme de diplocoque à gram positif, lancéolé, capsulé en forme de flamme de bougie très caractéristique, parfois associée en courtes chaînes(22)

Bien que classé parmi les streptocoques oraux, les pneumocoques s'en distinguent par leur pouvoir pathogène, leur aspect morphologique et par d'autres caractères biologiques(23).

- Les pneumocoques ont le caractère métabolique des *streptocoques*
- Ils sont groupés en **diplocoques** ou courtes chaînettes
- Ils possèdent une **capsule** de taille importante identifiée par agglutination
- Ils sont Immobiles et asporulés.



**Figure 1** : Aspect en coloration de Gram du *S. pneumoniae* (24).

#### **I.1.5.2. Caractères cultureux**

Anaérobie et aéro-tolérant, le SP est un germe exigeant cultivable sur des milieux enrichis (gélose au sang) (25).

Le germe pousse facilement en 18 heures sous 5% de CO<sub>2</sub> à une température comprise entre 20 et 45°C et un pH optimum de 7,2. Il donne des colonies petites, de 0,5 à 1,5 mm, de type S, transparentes, brillantes, non pigmentées, en goutte de rosée. Les colonies sont entourées d'une zone d'hémolyse verdâtre incomplète ( $\alpha$ -hémolyse).

En anaérobiose, l'hémolyse peut être complète (type  $\beta$ ) Ces bactéries sont fragiles, particulièrement sensibles aux variations de température et souvent incapables de croître lors des repiquages (26).



**Figure 2 :** Aspect du Pneumocoque sur une gélose au sang incubé en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>

### **I.1.5.3. Caractères Biochimiques**

Les *pneumocoques* sont des germes aéro-anaérobies à métabolisme fermentaire, qui présentent une capsule mise en évidence par l'encre de chine (antigènes capsulaires), ces germes ne possèdent pas de catalase, ni d'oxydase, ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable en partie de son autolyse. Les autres caractères sont :

- Nitrate : négatif
- Gélatine : négatif
- Lait tournesolé : acidifié et coagulé,
- Fermentation des sucres : acidification de la gélose, du lactose, de la raffinose, du saccharose...

Deux caractères sont plus intéressants :

- Esculine : négatif
- Inuline : négatif

Ces caractères ne sont guère recherchés pour l'identification du germe.

L'inuline, par contre, a servi à différencier le pneumocoque des autres streptocoques. Mais un certain nombre de streptocoques viridans peuvent fermenter aussi l'inuline : *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus uberis*.

L'identification formelle du pneumocoque repose en routine sur trois critères :

- La sensibilité à l'Optochine (éthylhydrocupréine, dérivé proche de la quinine), et en cas de doute ;

- La lyse par les selles biliaires (test de Neufeld) ;
- La mise en évidence des antigènes capsulaires (4).

Ils sont également sensibles à la Vancomycine en anaérobiose avec aspect dentelé et hémolyse  $\beta$  autour d'un diamètre d'inhibition(27).

#### **I.1.5.4. Caractères antigéniques**

La paroi du *pneumocoque* est constituée de l'intérieur vers l'extérieur par un mucopeptide (responsable de sa rigidité) ; le Polyoside C antigène pariétal R (commun à tous les *Streptocoques*). Le polysaccharide C détermine la présence dans le sang de la créatine protéine. La couche externe de la paroi est constituée par une protéine spécifique (de type protéine M) tout à fait comparable à celle du *Streptocoque*, mais n'entraîne pas la production d'anticorps protecteurs.

La substance spécifique soluble (SSS) n'existe pas dans les formes S (Smooth) virulentes parce qu'elle constitue le polysaccharide capsulaire. Ce polysaccharide capsulaire est responsable d'une spécificité de type entraînant chez l'homme la fabrication d'anticorps agglutinants, précipitant et protecteurs.

Plus de 90 sérotypes capsulaires sont actuellement connus (13). La fréquence d'apparition d'un sérotype peut varier d'une année à l'autre et d'une tranche d'âge à l'autre. Cependant chez les enfants, les types 6a, 6b,14,18c,19f, et 23f sont responsables de la moitié des infections, et chez l'adulte, les types 1,3,4,7f,8, et 12f. C'est justement pour cette raison que les types de vaccins préparés contiennent 23 polysaccharides capsulaires principaux (responsables de 90% des infections) couvrant tous les sérotypes habituellement trouvés à tous les âges.

#### **I.1.5.5. Facteurs de virulence**

Les facteurs suivants sont responsables de la virulence de SP

##### **a) La capsule**

Polyosides spécifiques de type S, la composition polymorphe de la capsule est à la base du sérotypage des souches. Actuellement il existe 90 sérotypes classés en 45 sérogroupes.

C'est le facteur principal de virulence grâce à ses propriétés anti-opsonophagocytaires (28, 29).

##### **b) La pneumolysine**

Apparentée à la streptolysine O du *S. pyogenes*, intracytoplasmique, elle est produite en anaérobiose, est thermolabile et oxygénolabile. Elle possède une activité cytotoxique de cellules respiratoires et endothéliales responsable de l'envahissement de l'arbre respiratoire (30)

### **c) Les protéines de surface**

Elles sont nombreuses et jouent un rôle d'adhésion aux cellules ciliées de l'arbre bronchique.

Il s'agit :

- De la protéine A de surface des pneumocoques : PspA
- De l'adhésine A de surface des pneumocoques : Psa A
- Des perméases-peptidiques : AmiA et PlpA
- Des acides lipoteichoïques de paroi

### **d) Protéines hydrolytiques cytoplasmiques**

Ces protéines jouent un rôle de colonisation et d'invasion. Il s'agit de :

- **La neuraminidase**

Elle est impliquée en particulier dans la diffusion méningée du pneumocoque en clivant les acides sialiques des glycoprotéines et glycolipides à la surface des muqueuses et des liquides biologiques diminuant la viscosité du mucus.

- **La hyaluronidase**

C'est une enzyme qui dépolymérise l'acide hyaluronique, composant important de la matrice extracellulaire. Elle contribue à la propagation du germe dans les tissus.

e) **Les protéases**

- **La sérine protéase**

Elle dégrade de façon non sélective les immunoglobulines, fibrinogène et autres protéines de la matrice extracellulaire, ceci facilite la pénétration des pneumocoques dans les muqueuses et le système sanguin.

- **L'IgA1 protéase**

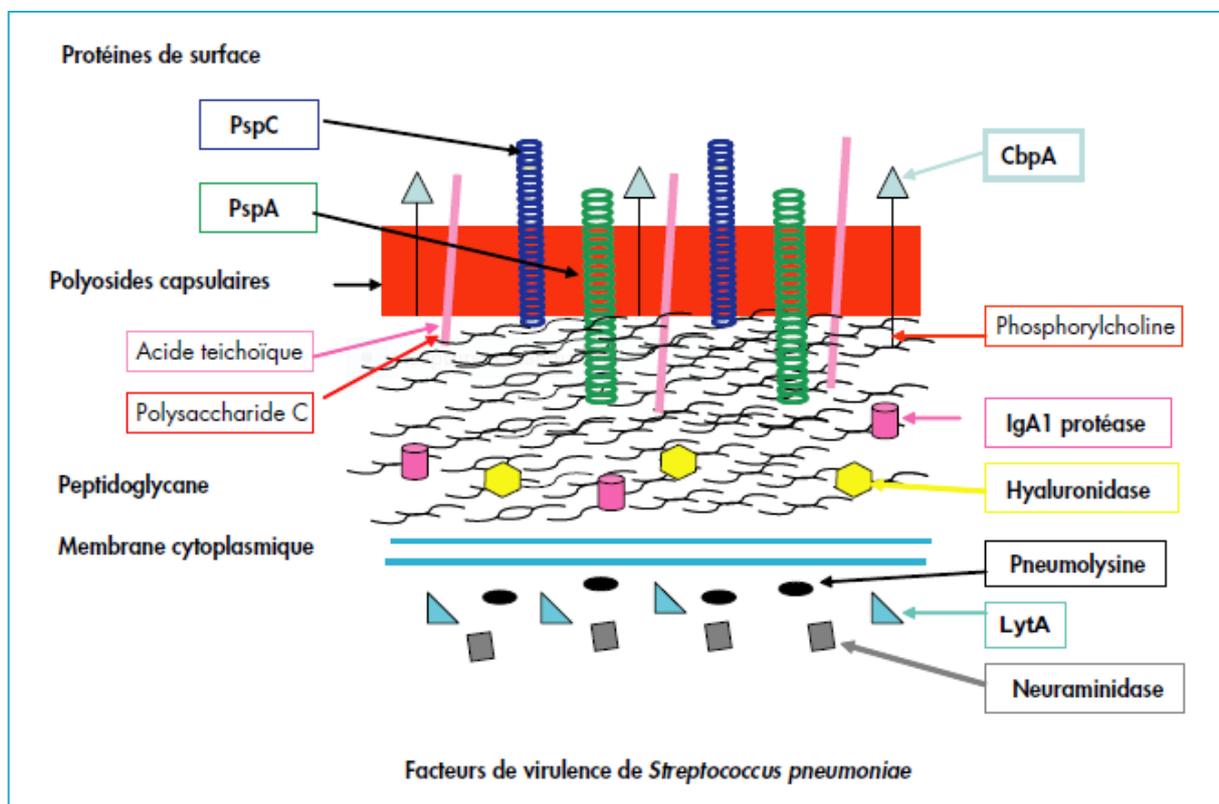
C'est une protéine hydrolytique cytoplasmique qui contribue aux phénomènes d'invasion et de colonisation, augmentant ainsi l'adhérence aux cellules épithéliales en présence d'IgA.

- **La leucocidine pneumococcique**

Analogue à la leucocidine staphylococcique elle lyse les leucocytes et contribue ainsi à la propagation du germe dans les tissus.

- **La choline binding protein A (CbpA)**

Elle n'interviendrait qu'à un stade avancé de la pathogenèse, entre la colonisation et l'invasion. Son affinité avec l'acide sialique permet l'activation de la production de cytokines. Elle interagit avec Rp pour Ig et favorise le passage à travers les muqueuses.



**Figure 3** : Structure de la paroi de *S. pneumoniae* (31).

### **I.1.6. Physiopathologie et Immunologie**

*S. pneumoniae* est un commensal habituel du nasopharynx de l'enfant. L'infection commence par une colonisation des muqueuses respiratoires, suivi d'une adhésion du *pneumocoque* aux cellules épithéliales. En effet, au cours des rhinopharyngites les modifications de l'épithélium respiratoire induites par l'infection virale contribuent à favoriser l'adhésion et la multiplication des bactéries.

#### **I.1.6.1. Colonisation des muqueuses respiratoires**

La colonisation du nasopharynx représente la première étape de l'infection aux pneumocoques (32). Cette colonisation est favorisée par des protéines de surface comme la choline binding protéine A (Cbp A) (33) et la neuraminidase (Nan A). Cette enzyme, va permettre une diminution de la viscosité du mucus et démasquer les récepteurs de surface favorisant ainsi l'adhésion(34).

#### **I.1.6.2. Etape de bactériémie**

Pour traverser la muqueuse, le pneumocoque utilise le mécanisme de transcytose des immunoglobulines de surface par fixation de la CbpA sur les récepteurs des immunoglobulines (35).

Cette migration à travers la matrice extracellulaire est favorisée par l'hyaluronidase (36), protéine de surface ancrée au peptidoglycane. La survie intra vasculaire face aux défenses de l'organisme est associée à la fois à la capsule polysaccharidique, aux protéines de surface Psp A et Psp C et à la pneumolysine. Le pouvoir pathogène du *pneumocoque* est également lié à l'aptitude de cette bactérie à induire une réaction inflammatoire intense qui favorise la dissémination tissulaire.

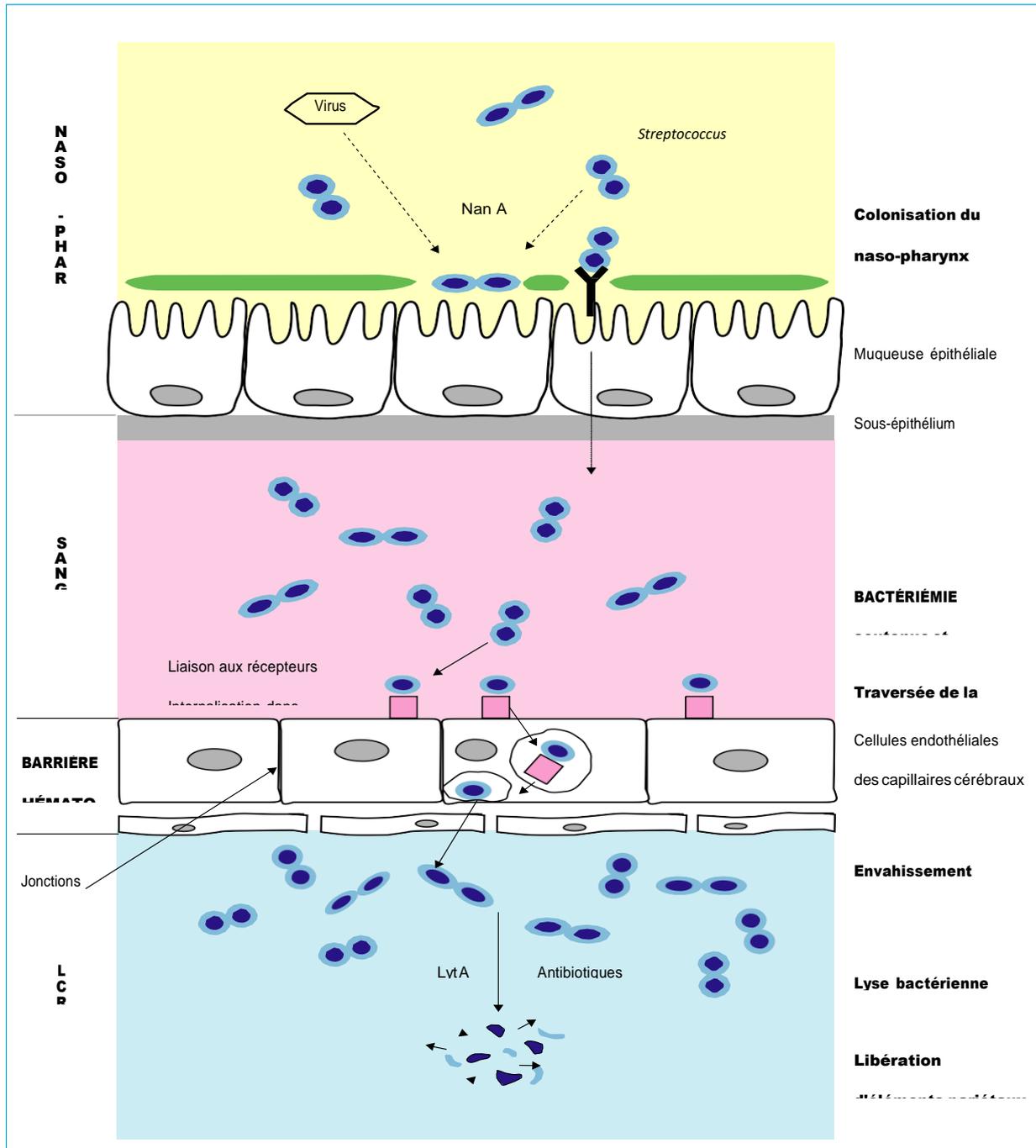
La multiplication prolongée et soutenue dans le sang au-dessus d'un seuil de magnitude est l'étape précédant la traversée de la barrière hémato méningée (BHM) (37).

#### **I.1.6.3. Traversée de la BHM**

La barrière hémato méningée est formée de l'endothélium des capillaires méningés et de l'épithélium des plexus choroïdes. L'endothélium des capillaires cérébraux est très sensiblement différent de celui qui tapisse les autres vaisseaux de l'organisme. Il est caractérisé par l'existence de jonctions serrées (zona occludens) entre les cellules endothéliales. Ces cellules sont de surcroît pauvres en vésicules de pinocytose, caractéristique qui témoigne de la faible activité de transcytose de celles-ci. *S. pneumoniae* va migrer vers les espaces méningés par voie transcellulaire. Cette étape requiert initialement l'adhésion aux cellules endothéliales médiée par l'interaction de la choline binding protéine

CbpA aux récepteurs cellulaires de PAF (*Plaquette Activating Factor*) suivie de l'internalisation vacuolaire pour être sécrétée au pôle basolatéral (35).

Dans le LCS, la multiplication de *S. pneumoniae* est rapide en raison de l'absence d'opsonines, de polynucléaires, d'immunoglobine et de pouvoir bactéricide naturel. La lyse bactérienne spontanée ou sous l'effet des antibiotiques, entraîne la libération d'éléments capsulaires et pariétaux à l'origine de la stimulation de cytokines et des séquelles neurologiques.



**Figure 4 :** Mécanismes physiopathologiques du pneumocoque (31).

### **I.1.7. Pouvoir pathogène**

*S. pneumoniae* est une des premières causes bactériennes dans le monde de sepsis, pneumonies, méningites, otites moyennes aiguës (OMA), et sinusites. Il est responsable d'une morbi-mortalité importante en particulier dans les infections pulmonaires et les méningites (38).

La contribution du *pneumocoque* à la mortalité globale est majeure, avec plus d'un million et demi de décès chaque année dans le monde, dont plus de la moitié sont notés chez l'enfant de moins de 5 ans essentiellement dans les pays à faible revenu (39).

Expérimentalement, l'inoculation d'une faible quantité d'un bouillon de *pneumocoque* injecté à la souris, tue l'animal par septicémie.

Par contre, dans l'organisme humain, il ne sécrète ni enzyme, ni toxine ; son pouvoir pathogène est essentiellement lié à son pouvoir de multiplication rapide, sa capsule et la pneumolysine (22).

### **I.1.8. Diagnostic bactériologique**

Le diagnostic bactériologique de l'infection pneumococcique repose essentiellement sur l'examen direct des liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, sang, liquide de ponction, crachats, prélèvements pulmonaires) ou de pus (otites).

Et sur la culture sur gélose au sang avec recherche dans un premier temps d'une hémolyse, d'une coloration au Gram positive qui permet parfois un diagnostic rapide d'orientation grâce à la morphologie assez caractéristique en diplocoque, et de l'absence de catalase.

La confirmation de cette identification rapide se fait dans un deuxième temps par la recherche d'une sensibilité à l'Optochine et d'un test de solubilité dans la bile (méthode immunologique des antigènes bactériens (solubles) dans les produits pathologiques par l'utilisation du Pastorex qui est plus rapide) (6).

Enfin, dans les cas difficiles, il est possible d'avoir recours à des techniques de biologie moléculaire comme la Polymerase Chain Reaction (PCR) qui permet une détection rapide des pneumocoques et de leurs résistances (40).

## **I.2. Généralités sur les antibiotiques**

### **I.2.1. Définition**

Le terme antibiotique signifie toute substance d'origine naturelle ou synthétique ayant une toxicité sélective sur les micro-organismes visés et au contraire une toxicité suffisamment faible vis-à-vis de l'hôte humain, animal ou végétal pour que son administration puisse être réalisée par voie générale.

## I.2.2. Classification et mécanisme d'action

Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie.

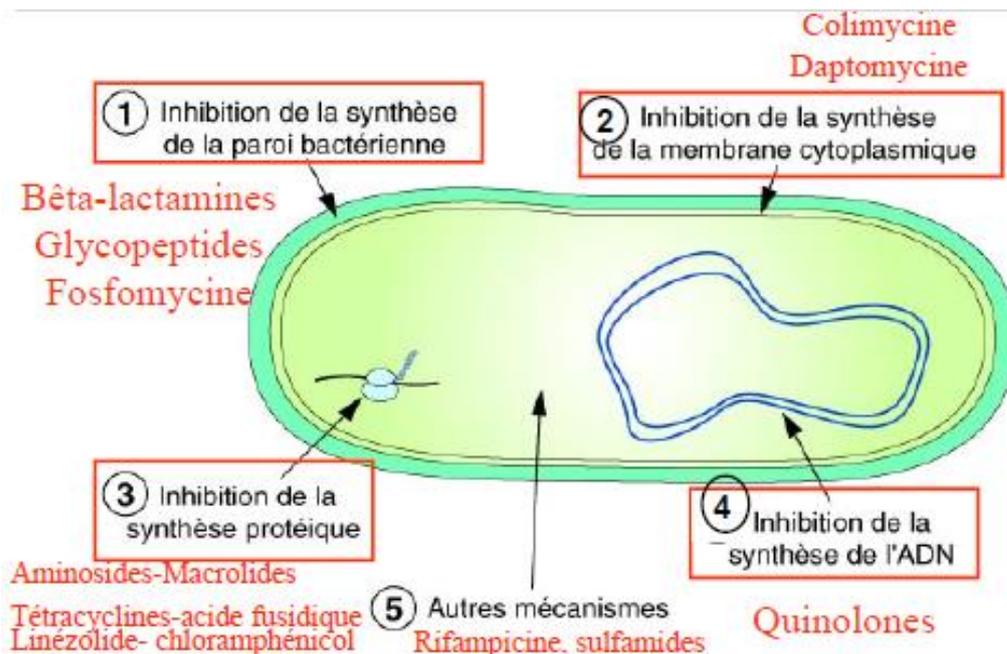
Ils agissent par :

- **Toxicité sélective au niveau de la :**

- Synthèse de la paroi bactérienne
- Membrane cytoplasmique
- Synthèse des protéines
- Acides nucléiques

- **Inhibition compétitive :** dans ce cas l'antibiotique est un analogue structural, il interfère avec une fonction essentielle à la bactérie.

La classification des antibiotiques peut se faire selon plusieurs critères (origine, mode d'action, spectre d'activité, nature chimique). Cependant, nous allons nous focaliser sur la classification selon le mécanisme d'action.



**Figure 5 :** Classification des antibiotiques selon le mode d'action (41).

### Les inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

Il s'agit des  $\beta$  lactamines, glycopeptides et fosfomycine.

Les  $\beta$  lactamines sont une famille qui comprend 5 groupes majeurs : les Pénames, les pénèmes, les oxapénames, les céphèmes et les monobactames. Par toxicité sélective, Ils agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP). Les PLP ont une activité transpeptidasique, carboxypeptidasique et transglycolasique. L'inhibition des PLP aboutit à l'inhibition de la formation des ponts pentacycliques

responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes bizarroïdes (rondes ou filamenteuses) qui aboutissent à la lyse.

Les glycopeptides agissent en bloquant la polymérisation du peptidoglycane par un mécanisme complexe.

La fosfomycine agit sur la paroi bactérienne à un stade précoce lors de sa synthèse (42-46).

#### **I.2.2.1. Les Antibiotiques actifs sur les enveloppes membranaires**

Il s'agit de la polymyxine et la daptomycine.

Ils possèdent une charge positive et agissent comme des agents tensio-actifs. Ils agissent sur la membrane cellulaire en se fixant sur les phospholipides d'où rupture de la barrière osmotique (42, 43)

#### **I.2.2.2. Les Inhibiteurs de la synthèse des protéines**

Ce sont : les Aminosides, Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS), les Tétracyclines, les Phénicolés, les Oxazolidinones.

Les MLS sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines, ils agissent au niveau de la s/unité 50S du ribosome. Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation.

Les tétracyclines agissent sur la Sous unité 30S du ribosome. Ils inhibent la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique et empêchent la fixation de l'aminoacyl-ARNt.

Les Phénicolés agissent sur la Sous unité 50S du ribosome et inhibe la polymérase.

Les Oxazolidinones interagissent avec l'unité ribosomale 50S et ont un mécanisme d'action complexe.

L'acide fucidique, un ATB non classé, agit en inhibant la synthèse protéique interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G) (42-44, 47-49).

#### **I.2.2.3. Les Inhibiteurs des acides nucléiques**

Ils sont : les Quinolones et Fluoroquinolones, les Rifamycines, les Nitrofuranes, les Novobiocine et Nitro-imidazoles.

Les quinolones et fluoroquinolones Inhibent de façon sélective la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliqués dans cette synthèse : l'ADN gyrase et l'ADNtopo-isomérase IV. Les rifampicines Inhibent la transcription de l'ADN en ARN messenger (ARNm) par inhibition de l'ARN polymérase et les nitrofuranes agissent directement sur l'ADN provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases) (43, 44, 48).

#### **I.2.2.4. Inhibiteurs de la synthèse des folates**

Il s'agit des Sulfamides, Trimethoprime et association

Ils Inhibent la synthèse des folates, acides puriques et acides nucléiques en se fixant sur deux enzymes : la dihydroptéroate synthétase (DHPS) et la dihydrofolate réductase (48, 50).

### **I.2.3. Résistance aux antibiotiques**

#### **I.2.3.1. Définition**

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques », qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se recoupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance *in vitro*) et sur les critères cliniques (résistance *in vivo*). Selon la définition microbiologique du terme, une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence de concentration plus élevée en antibiotique comparativement à d'autres souches qui lui sont phylogénétiquement liées. Par conséquent, la résistance est une propriété qui ne peut être étudiée que par comparaison d'au moins deux souches, dont l'une de référence souvent appelée souche sauvage et développée en laboratoire à partir d'individus prélevés dans la nature, d'une même espèce ou d'un même genre, cultivées dans les mêmes conditions. Selon la définition clinique, une souche est qualifiée de résistante lorsqu'elle survit à la thérapie antibiotique mise en place. En outre, il est important de signaler, qu'en conditions *in vivo*, la capacité de résistance ou de sensibilité de la souche à la thérapie antimicrobienne mise en place sera dépendante de différents paramètres, tels que la localisation de la bactérie, le dosage et le mode d'administration de l'antibiotique, et l'état du système immunitaire de l'individu traité.(51)

#### **I.2.3.2. Mécanisme de résistance**

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule.

##### **a. Inactivation enzymatique de l'antibiotique**

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, Streptogramines), pour les tétracyclines, pour la fosfomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un

groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. (51)

#### **b. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique**

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérien ne puisse plus se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit pour presque tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les Diamino pyrimidines (Triméthoprim) et le bêta-lactames. (51)

#### **c. Pompes à efflux**

L'efflux actif, médié par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et utilisé par les bactéries, par les cellules eucaryotes dont notamment les protozoaires, pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. On classe ces pompes à efflux sur base notamment de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée. Certains de ces transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes SDR (pour *specific drug-resistance*), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour *multiple-drug-resistance*). (51)

#### **d. Perméabilité réduite**

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycane que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la

couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui leur confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatives étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible. (51)

### **I.2.3.3. Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques**

Les pneumocoques restent dans l'ensemble sensibles à la plupart des antibiotiques actifs sur les germes à Gram positif : pénicillines et dérivés, érythromycine, tétracyclines, chloramphénicol, lincosamines, synergistines sulfamides et vancomycine.

Ils sont résistants aux aminosides comme les autres streptocoques. Les pénicillines constituent l'antibiothérapie de choix contre les pneumocoques car les concentrations minimales inhibitrices de la péni G contre les pneumocoques sont très basses (0,01mg/l), et les rares souches isolées présentant un niveau de résistance plus élevé (0,16-0,32mg/l) restent accessibles à une antibiothérapie à doses thérapeutiques.

Quelques souches de pneumocoque sont résistantes à l'érythromycine et la lincomycine. En revanche, près de 30% des souches isolées de produits pathologiques sont résistantes aux tétracyclines. Lorsque *S. pneumoniae* est sensible à la pénicilline, les pénicillines A (Ampicilline et amoxicilline) restent le traitement de référence.

En pratique en dépit de la progression de la résistance, beaucoup de souches restent sensibles ou intermédiaires (CMI < 1mg/l), et l'augmentation des doses de  $\beta$ -lactamines est le plus souvent suffisante pour traiter ces infections, à l'exception des méningites. Les souches ayant un haut niveau de résistance à la pénicilline avec des CMI à 2 mg/L sont de traitement beaucoup plus difficile car cette résistance est souvent associée à une résistance pour des antibiotiques d'une autre famille (érythromycine, chloramphénicol, clindamycine, triméthoprime-sulfaméthoxazole). La vancomycine, la pristinaamycine, la rifampicine et certaines nouvelles quinolones (chez l'adulte) restent actives.

Les infections oto-rhino-laryngologique et pulmonaire à pneumocoque sont traitées avec succès par la pénicilline G ou l'ampicilline. En cas d'allergie à la pénicilline, le chloramphénicol et l'érythromycine sont également très actifs.

Le triméthoprime-sulfaméthoxazole a également une excellente diffusion pulmonaire, et il est également très efficace dans ce type d'infection.

Le traitement de la méningite à pneumocoque est basé sur l'utilisation de l'ampicilline à fortes doses. Les céphalosporines de 3ème génération (type céfotaxime, céftriaxone le chloramphénicol et le Trimethoprim-sulfaméthoxazole, à bonne diffusion méningée peuvent également être utilisés à fortes doses avec succès.

#### **I.2.4. Prophylaxie**

Le risque pneumococcique est parfaitement identifié comme un problème de santé publique par sa gravité et sa fréquence. La vaccination représente un des moyens de prévention efficace. Au-delà de l'immunité individuelle qu'elle confère, elle induit une protection collective qui peut permettre d'éliminer la maladie, si une couverture vaccinale élevée est atteinte.

Le polysaccharide capsulaire du pneumocoque, facteur essentiel de virulence, est la cible d'anticorps protecteurs et a donc été identifié dès 1940 comme un antigène vaccinal d'intérêt. Il a cependant fallu attendre l'application de la technologie de conjugaison polysaccharide-protéine pour rendre l'antigène vaccinal immunogène dès l'âge de 6 semaines (52).

Il existe actuellement deux vaccins anti-pneumococques commercialisés :

Le vaccin polysaccharidique non conjugué (Pneumo 23) et le vaccin polysaccharidique conjugué.

## **II. Matériel et Méthodes**

### **II.1.1. Méthodes**

#### **II.1.1.1. Cadre d'étude**

L'étude s'est déroulée à l'Institut National de Recherche en santé publique (INRSP) plus précisément au service de bactériologie virologie à Bamako.

#### **Description de l'INRSP**

Créé par la loi N° 81-17/AN-RM du 31 mars 1981, et érigé en Établissement Public à caractère Administratif (EPA) par la loi N° 93-014 du 11 février 1993, l'INRSP est passé de ce statut à celui d'Établissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST) par l'ordonnance N° 06-007/P– RM du 28 Février 2006.

#### **Missions :**

- Promouvoir la recherche médicale et pharmaceutique en santé publique, notamment dans les domaines des maladies infectieuses, néoplasiques et sociales, de la santé familiale, de l'éducation sanitaire, de l'hygiène du milieu, de la biologie clinique appliquée à la nutrition et aux affections endémo-épidémiques, de la toxicologie médicale et expérimentale, de la bromatologie, de la génétique, de la socio économie, de la médecine et pharmacopée traditionnelle ;
- Participer à la formation technique, au perfectionnement et à la spécialisation dans le domaine de sa compétence ;
- Assurer la référence dans le domaine de la biologie clinique ;
- Assurer la mise au point et la formulation des médicaments traditionnels améliorés ;
- Assurer la protection du patrimoine scientifique relevant de son domaine ;
- Promouvoir la coopération nationale et internationale dans le cadre des programmes et d'accords d'assistance mutuelle ;
- Gérer les structures de recherche qui lui sont confiées.

#### **Composition :**

L'INRSP comprend cinq départements et une agence comptable qui sont :

- Département Santé Communautaire (DSC) ;
- Département Médecine Traditionnelle (DMT) ;
- Département Formation (DF) ;
- Département Administration et Personnel (DAP) ;
- Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRB).

Le Département de Diagnostic et de Recherche Biomédicale (DDRB) se compose de six services :

- Sérologie-Immunologie ;
- **Bactériologie-virologie** ;
- Hématologie biologie ;
- Biochimie clinique ;
- Parasitologie ;
- Cytogénétique.

En outre, l'institut dispose des centres de formation en zone rurale qui sont :

- Le centre de Sélingué ;
- Le centre de Kolokani ;
- Le Centre Régional de Médecine traditionnelle de Bandiagara (CRMT).

#### **II.1.1.2. Type d'étude**

Il s'agissait d'une étude prospective à visée descriptive qui a porté sur des prélèvements d'expectoration reçus en routine à l'INRSP.

#### **II.1.1.3. Période d'étude**

La collecte des échantillons s'est déroulée de novembre 2017 à janvier 2019

#### **II.1.1.4. Population d'étude**

Constitué de patients provenant des hôpitaux et des centres de santé chez qui les examens bactériologiques des prélèvements d'expectoration ont été analysés au laboratoire de bactériologie de l'INRSP de Bamako.

#### **II.1.1.5. Collecte des données**

Les données socio démographiques des patients ont été collectées à partir du registre de la paillasse des pus du service de bactériologie virologie.

### **II.1.2. Matériel**

#### **II.1.2.1. Matériel de laboratoire**

Le matériel utilisé pour réaliser les examens bactériologiques classiques et les tests d'antibiogramme sont listés dans l'annexe.

#### **I.1.1.1. Matériel biologique**

Les échantillons d'exportation reçue à l'INRSP nous ont servi de matériels biologiques pour notre étude.

#### **I.1.1.1. Critères d'inclusion**

Ont été inclus dans l'étude, tous les prélèvements d'expectorations dans lesquels le pneumocoque a été isolé.

### **I.1.1.2. Critères de non-inclusion**

N'ont pas été inclus dans l'étude, tous les prélèvements d'expectorations avec demande de recherche de BAAR et de mauvaise qualité (contaminé par la salive).

## **I.1.2. Méthodes Expérimentale**

### **I.1.2.1. Prélèvement**

- **Expectoration**

Le recueil de l'expectoration a été fait suivant un protocole élaboré à cet effet :

Le matin, au réveil, après rinçage bucco-dentaire à l'eau, le patient tousse et produit des expectorations qui sont recueillis dans un pot stérile.

#### **I.1.2.1.1 Techniques et méthodes de prélèvement du crachat**

Objectif : L'examen cyto bactériologique d'un crachat (ECBC) peut aider à faire un diagnostic microbiologique d'infection respiratoire basse en isolant le (les) micro-organisme(s) responsable(s), en le (les) identifiant, en déterminant sa (leur) sensibilité aux anti-infectieux. Ce diagnostic microbiologique est délicat à établir pour de nombreuses raisons :

- contamination systématique du prélèvement par la salive et la flore aérodigestive,
- certaines espèces bactériennes responsables d'infections pulmonaires sont présentes à l'état commensal dans l'oropharynx et la salive (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, ...),
- certaines espèces bactériennes ne sont pas cultivables sur les milieux de cultures usuels (*Legionella*, *Chlamydia*, mycoplasmes, mycobactéries,...). Pour toutes ces raisons, on rappelle que le diagnostic microbiologique d'infection respiratoire basse doit être préférentiellement réalisé par d'autres prélèvements :
- hémocultures (systématiques en cas de fièvre),
- recherche d'antigènes urinaires (*Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*),
- recueil des sécrétions broncho-pulmonaires lors de prélèvements protégés : brossage bronchique protégé (BBP), lavage broncho-alvéolaire (LBA), aspiration endotrachéale (AET),
- examens sérologiques (*Legionella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Mycoplasma*).

Techniques et méthodes : Les principales indications de l'ECBC sont :

- le diagnostic d'une tuberculose pulmonaire (dans ce cas, bien le préciser sur la fiche de demande),
- le diagnostic d'une pneumopathie à germe atypique (*Legionella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Mycoplasma*). Dans ce cas, bien le préciser sur la fiche de demande.
- L'aide au diagnostic d'une pneumopathie à germes classiques, quand il n'est pas possible d'obtenir des prélèvements protégés.

## I PRELEVEMENT DU CRACHAT

Ce prélèvement nécessite une technique de recueil irréprochable pour que la contamination soit limitée et que le résultat soit interprétable.

- Expliquer au patient l'importance des consignes suivantes.
- Faire pratiquer un lavage des dents et un rinçage abondant de la bouche (en cas de besoin, effectuer un soin de bouche).
- Prélever les expectorations obtenues après des efforts de toux. Le prélèvement est de meilleure qualité lorsqu'il est réalisé après kinésithérapie.
- Recueillir des expectorations dans un poudrier stérile.

## II ENVOI AU LABORATOIRE

- Identifier le prélèvement et le placer dans un sac en plastique.
- Remplir la fiche de demande d'examen en précisant l'orientation clinique de la demande et les germes spécifiques à rechercher (BK, légionelles, etc...).
- Adresser le prélèvement au laboratoire le plus rapidement possible pour éviter la pullulation des bactéries commensales aux dépens des bactéries fragiles (moins de 30 minutes).
- Ne jamais conserver ce prélèvement au froid.

### I.1.2.2. Examen directe

Après prélèvement, les échantillons ont été transportés au laboratoire puis soumis aux différents examens.

- **Examen macroscopique :**

Les échantillons ont été soumis à une observation macroscopique qui a permis d'apprécier les aspects purulent, muqueux, muco-purulent, turbidité ou sanguinolent.

- **Examen microscopique**

Pour les expectorations la technique décrite par Bartlett et adaptée par Murray et Washington, a permis d'apprécier le degré de contamination par la salive. Elle a consisté à examiner soit à l'état frais, soit en utilisant un frottis coloré par la méthode de Gram puis observé au microscope à grossissement x 100 et à dénombrer en faisant une moyenne sur 10 champs les cellules épithéliales et les leucocytes par champ (après vérification de la morphologie à un grossissement plus fort). Les résultats de l'examen microscopique nous ont permis de distinguer 5 classes de crachats :

Classe	Cellules par champ	
	Epithéliales	Leucocytes
1	>25	<10
2	>25	10-25
3	>25	>25
4	10-25	>25
5	<10	>25

Les crachats de classe 1 et 2 étaient de mauvaise qualité (fortement contaminés par la salive). Ils n'ont pas été utilisés pour la culture. Un autre prélèvement a été demandé. Les crachats de classe 3, 4 ont un nombre de leucocytes qui témoigne d'une réaction inflammatoire mais sont contaminés par la salive. Les crachats de classe 5 ont été les plus appropriés pour l'examen bactériologique, ceux de classe 4 ont aussi été acceptés.

### **I.1.2.3. Coloration de Gram**

- **Principe**

La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en microorganismes Gram positif et en micro-organismes Gram négatif.

Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et auront une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram négatif sont décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution d'alcool acétone.

Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuchsine basique

#### **Procédure de la coloration :**

- Après identification de la lame à l'aide d'un crayon de papier (le numéro de dossier du patient, la date et l'initial du technicien).
- Un frottis mince a été confectionné sur la lame de verre et séché à l'air libre ;
- Lorsque la lame est complètement sèche, elle est tenue contre la flamme du bec bunsen jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher
- Le Violet de Gentiane est mis sur le frottis de la lame pendant 30 à 40 secondes ; le surplus de la solution de Violet de Gentiane est versé et la lame est rincée avec un jet d'eau faible. L'excès d'eau est égoutté à l'aide d'un papier buvard. Et un faible jet d'eau est utilisé pour laver la lame ;
- La lame est recouverte par la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;

La lame égouttée et rincée avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté sur du papier buvard ;

Goutte à goutte la solution de décolorant alcool- acétone est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;

Immédiatement après, la lame est rincée avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;

- La solution de safranine (ou la fuchsine basique) est mise sur le frottis pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;
- La safranine est versée et la lame est rincée en la tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau. Prudemment, la lame est séchée avec d'un papier buvard.

- **Interprétation**

Après séchage, la lame est observée au microscope optique avec l'objectif 100 en immersion.

#### **I.1.2.4. Culture**

La culture a été faite sur une gélose au sang frais ANC (Acide Nalidixique Colistine : antibiotiques qui inhibent les bactéries à Gram négatif) qui est un milieu riche permettant la culture et l'isolement des bactéries exigeantes comme le pneumocoque [8].

Cette gélose a étéensemencée (strie) avec 0,1 ml de la suspension du prélèvement et mise en incubation à 37°C sous 10 % de CO<sub>2</sub> pendant 24 à 48 heures.

#### **I.1.2.5. Identification**

Les souches de pneumocoque ont été identifiées sur la base des caractères morphologiques, culturels, et biochimiques (alpha hémolyse, sensibilité à l'Optochine et lyse par la bile).

- **REACTION D'HEMOLYSE**

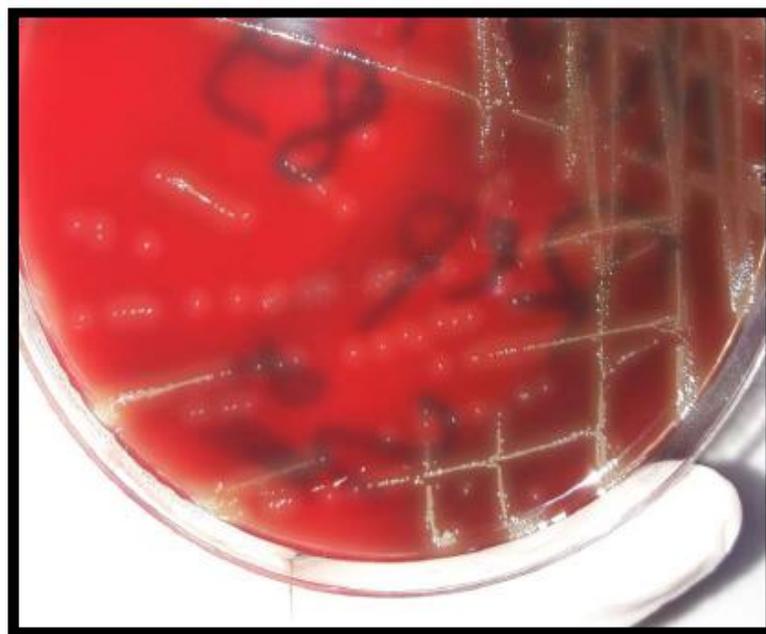
Une atmosphère d'incubation enrichie en CO<sub>2</sub> (5 à 10%) voire une atmosphère anaérobie favorise l'expression de l'hémolysine. Sur la gélose au sang, les colonies sont entourées d'un halo verdâtre traduisant l'hémolyse incomplète des hématies. L'habileté des bactéries à lyser les cellules du 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 rouges du sang. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra clair.
- **Alpha-hémolyse** : C'est une lyse incomplète des globules rouges. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra verdâtre.
- **Gamma hémolyse** : 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 observé autour des colonies.

Parmi les exemples de bactéries Beta-hémolytiques on retient les Streptocoques du Groupe A et B.

Parmi les exemples de bactéries alpha-hémolytiques on retient le *Streptococcus pneumoniae* et quelques autres espèces de *Streptococcus*.

Parmi les exemples de bactéries gamma ou non-hémolytique on retient quelques espèces de Streptocoques.



**Figure 6 :** Zone d'hémolyse partielle (alpha) donnant à la gélose une couleur verdâtre (décoloration verte autour des colonies)

- **TEST A L'OPTOCHINE**

La sensibilité du pneumocoque à l'Optochine est l'une des critères sur lesquels repose son identification formelle en pratique. C'est un test spécifique qui permet d'identifier de façon rapide et présomptive les souches de *S.pneumoniae*. Le disque d'Optochine (P) contient l'Optochine qui inhibe la croissance de *Streptococcus pneumoniae*. Avant l'exécution du test, il convient de confirmer la ressemblance du micro-organisme à *Streptococcus pneumoniae*, c'est à dire des diplocoques Gram positif qui apparaissent allongés et attaches à leurs bouts. Les colonies sont alpha hémolytiques et peuvent apparaître aussi bien sèches que muqueuses.

**Procédure :**

- le micro-organisme est ensemencé sur une gélose au sang, dans l'espace où la croissance est la plus dense (c'est à dire la première partie de la boîte qui est inoculée), un disque d'Optochine est placé.
- la boîte est mise dans l'incubateur à 37°C, sous 5% de CO<sub>2</sub>.

Le lendemain de l'incubation, la gélose au sang est examinée pour voir l'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque d'Optochine. La sensibilité est donnée par le diamètre de la zone d'inhibition.

**Interprétation :**

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

**Réaction Négative** = zone d'inhibition autour du disque d'Optochine de moins de 15 mm (c'est à dire entre 6 et 15 mm). Un résultat positif est indicatif de *Streptococcus pneumoniae*. Une réaction négative n'exclut pas *Streptococcus pneumoniae* ainsi toutes réactions négatives devraient être confirmées par un test de «bile solubility». Si le test d'Optochine et le test de «bile solubility» sont tous les deux négatifs, le microorganisme identifié n'est pas *Streptococcus pneumoniae*. Si l'un ou l'autre des tests est positif, le micro- organisme est identifié comme étant *Streptococcus pneumoniae*.



**Figure 7 :** Identification du pneumocoque avec un disque d'optochine ( zone d'inhibition créée par la pose d'un disque d'optochine ).

- **RECHERCHE DES ANTIGENES CAPSULAIRES PAR LE TEST D'AGGLUTINATION**

L'agglutination avec des particules de latex sensibilisées par des anticorps anti-capsulaires peut permettre de confirmer l'identification du *S. pneumoniae*.

La détection des antigènes capsulaires (antigènes solubles) par agglutination latex constitue une méthode diagnostique d'appoint intéressante surtout quand le patient a reçu des antibiotiques avant le prélèvement (infection décapitée).

#### **I.1.2.6. Antibiogramme**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et à conforter l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

- **Test de Sensibilité aux antibiotiques :**

Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon KIRBY-BAUER

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion des 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 appropriée pour la thérapie.

**Principe :**

La méthode de diffusion des 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 du disque d'antibiotique 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 micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

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

**Conditions de stockage nécessaires :**

Milieux de culture MHA-B : A conserver au réfrigérateur (4-8°C), 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 moins 20°C ou à une température plus basse 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 :**

La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour *Streptococcus pneumoniae* ;

Les disques pour le test de sensibilité ont été régénérées à la température de la salle avant leur utilisation, auparavant ils auront été enlevés du récipient de conservation. Il ne faut pas exposer les disques froids à l'air de la salle parce que la condensation de l'humidité sur les disques froids conduirait à une détérioration rapide des antibiotiques. Les dates d'expiration sont vérifiées sur les récipients des antibiotiques ; les disques périmés ne sont pas utilisés.

Au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang sont sélectionnées. Le sommet de chaque colonie est touché avec une anse et les transférée dans un

tube de solution saline. L'inoculum de la solution saline est ajusté à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de Mac Farland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté ;

Un écouvillon stérile trempe dans la suspension ajustée. L'écouvillon est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. La surface entière de la boîte de gélose est inoculée en faisant tourner la boîte d'approximativement 60 °C et l'ensemencement est fait de nouveau. La boîte est tournée et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;

Une boîte de gélose est inoculée pour *Streptococcus pneumoniae*, et deux pour les bacilles Gram négatifs ;

L'excès d'humidité doit être absorbé par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. Les disques d'antibiotique sont placés sur la boîte en utilisant des pinces stériles. Le disque est pressé sur la surface de la gélose avec des pinces stériles pour s'assurer du contact complet avec la surface de la gélose. Ne plus enlever le disque une fois qu'il est arrivé au contact avec la surface de la gélose parce que l'antibiotique diffuse presque immédiatement dans la gélose.

Les applicateurs de disques d'antibiotiques sont souvent utilisés ;

Les disques d'antibiotiques suivants seront testés :

Pour *Streptococcus pneumoniae* : Oxacilline 1 µg (pour le test de Pénicilline 10 UI), Tétracycline 30 µg, Erythromycine 15 µg, Chloramphénicol 30 µg ; Cotrimoxazol 1,25/23,75 µg.

Les espèces *Streptococcus* sont placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>.

Tous les autres micro-organismes devraient être placés dans un incubateur en aérobiose.

### **Interprétation :**

Tous les tests de sensibilité sont lus après 20 à 24 heures d'incubation. Si les examens sont lus plutôt ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis.

Les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque sont mesurés, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins. La limite est l'aire dans laquelle une croissance évidente est visible à l'œil nu, exceptée la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.

La croissance de larges colonies à l'intérieur d'une zone d'inhibition claire devrait indiquer un mélange de croissance. Si tel est le cas, alors la sensibilité est mixée le test doit être repris. Si les colonies persistent dans la zone, il faut les considérer comme significatives ; Avec le Cotrimoxazol, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. On ne tiendra pas compte de la faible croissance, on doit lire seulement les limites de la croissance en abondance ;

On se réfère à la grille de sensibilité des disques pour l'interprétation des tests.

Les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 5 µg est utilisé. Ne pas reporter les résultats comme Oxacilline mais plutôt les reporters comme Pénicilline.

#### **I-1.2.7 Pneumocoque de sensibilité diminuée aux pénicillines**

Les pénicillines sont depuis les années 1940 le traitement de référence des infections à pneumocoque. Cependant, depuis les années 1970, sont apparues des souches de sensibilité diminuée aux pénicillines (PSDP). Les PSDP ont engendré des difficultés thérapeutiques dans les infections invasives à pneumocoques (IIP).

#### **Action antibactérienne des β –lactamines**

Les β -lactamines (BL) bloquent par liaison irréversible les Protéines Liant les Pénicillines ou PLP qui interviennent dans la synthèse de la paroi bactérienne. Ce mécanisme permet la bactériostase et déclenche le système autolytique responsable d'une bactéricidie, tempsdépendante. Cette bactéricidie intervient dès l'atteinte des CMI mais tue lentement.

La durée d'exposition de la bactérie au-dessus de la CMI est le facteur primordial d'efficacité des BL. La pharmacocinétique et la fréquence d'administration permettent de maintenir les concentrations au site infectieux au-dessus de la CMI (Figure 1). Les CMI des pénicillines des souches sauvages de pneumocoques sont particulièrement faibles (10 fois plus faibles que les CMI des autres Streptocoques) et l'amoxicilline est le traitement de première intention des infections bactériennes aiguës respiratoires communautaires (otites, sinusites et pneumonies simples hors contexte grippal).

### **Mécanisme de résistance du pneumocoque**

Le pneumocoque a naturellement la faculté d'absorber de l'ADN extérieur dont des gènes de PLP d'autres espèces Streptocoques de la sphère ORL. Ces fragments de gènes présentent des zones d'homologie importante avec les PLP du pneumocoque qui permettent une recombinaison du gène de PLP en un gène mosaïque qui va modifier l'affinité de la PLP aux BL d'un facteur 2 à 100. L'utilisation répétée des BL augmente la pression de sélection des pneumocoques ayant des PLP mutées au niveau de la flore commensale de la sphère ORL.

Note: L'acide clavulanique n'a aucune influence sur ce mécanisme

**Dépistage des PSDP et mesure de la résistance aux  $\beta$ -Lactamines:** Les souches de pneumocoques des isolats d'examen microbiologiques font toutes l'objet d'un dépistage d'une sensibilité diminuée aux pénicillines par un test à l'oxacilline. Si le test est négatif, la souche est très sensible aux BL; si le test est positif, la souche est un PSDP dont les CMI aux principales BL sont mesurées. L'augmentation des CMI expose au risque d'échec thérapeutique puisque la concentration résiduelle de BL au site infectieux assurée par la posologie peut devenir insuffisante pour dépasser de façon prolongée la CMI de la souche. La bactéricidie par la BL est alors interrompue à chaque moment où la concentration in est inférieure à la CMI, et l'inoculum bactérien ne diminue pas.

### **Macrolides et kétolides**

Les macrolides représentaient l'alternative de choix dans le traitement des infections respiratoires à pneumocoque. Mais depuis 1984, la résistance aux macrolides a beaucoup progressé à travers le monde comme en France où elle atteint 51% en 2001. La prévalence de la résistance aux macrolides est encore plus élevée parmi les pneumocoques de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines, où elle approche 90%.(53). En France, la résistance aux macrolides est le plus souvent liée à une modification de leur cible, la sous-unité 50S du

ribosome bactérien, sous la dépendance du gène *ermB* essentiellement. La résistance, le plus souvent inductible, touche alors l'ensemble des macrolides et confère une résistance croisée aux lincosamides et aux streptogramines B (phénotype de résistance MLS<sub>B</sub>). Un autre mécanisme décrit récemment est lié à un efflux spécifique sous la dépendance du gène *mefE*. Dans ce cas, la résistance ne concerne que les macrolides à 14 ou 15 atomes de carbone. L'activité des macrolides à 16 atomes de carbone (spiramycine, josamycine, midécamycine), des lincosamides et des streptogramines est conservée. Ce mécanisme de résistance, qui est prépondérant aux Etats-Unis, au Canada, et au Royaume-Uni par exemple, est très peu répandu en France (54) (B inductible ou par efflux, avec 99% de souches sensibles actuellement).

#### **I-1.2.8 Technique du D-Test**

Toute souche résistante à l'érythromycine et sensible à la clindamycine, le caractère inductible de cette résistance doit être recherché par la mise en évidence d'un antagonisme entre ces deux molécules (D-test®).

Elle consiste à disposer les disques d'érythromycine de lincomycine (clindamycine) et de pristnamycine côte à côte. Lorsqu'une bactérie exprime le phénotype MLS B, la zone d'inhibition autour du disque de clindamycine est aplatie pour donner une forme "D" (test D positif), alors que dans le phénotype MS, la zone de clindamycine reste circulaire (test D négatif) (55)

#### **I.1.3. Traitement et analyse des données**

Les données ont été saisies sur Excel 2016, traitées sur IBM SPSS V 20 et EndNoteX5 utilisées pour les références.

#### **I.1.4. Considération éthique**

Le protocole a été soumis à l'approbation du comité d'éthique de l'INRSP avant sa mise en œuvre. Les principaux aspects éthiques pris en compte ont été les suivants

- Confidentialité et anonymat
- Consentements éclairés
- La méthode de prélèvement utilisée au laboratoire ne présentait pas de risque pour les patients.

## Diagramme de Gantt

<b>Revue de la littérature</b>					
<b>Etude expérimentale</b>					
<b>Analyse des données</b>					
<b>Rédaction</b>					
<b>Soutenance</b>					
	1/11/2017 au 16/5/2019	1/11/2017 au 1/1/2019	1/2/2019 au 1/3/2019	9/2/2018 au 1/9/2019	9/10/2019 au 4/12/2019

## RESULTATS

### Fréquences d'isolement du pneumocoque dans les expectorations analysées à l'INRSP.

**Tableau I** : Répartition des germes isolés après culture les expectorations analysées de novembre 2017 à Janvier 2019

Germe	Fréquence	Pourcentage
Klebsiella pneumoniae	85	16,8
Entérocoque	39	7,7
Pseudomonas	34	6,7
Escherichia coli	34	6,7
<b>Pneumocoque</b>	<b>31</b>	<b>6,1</b>
Acinétobacter	20	3,9
Staphylococcus aureus	16	3,1
Streptococcus spp	10	1,9
Indéterminé	236	46,7
<b>Total</b>	<b>505</b>	<b>100,0</b>

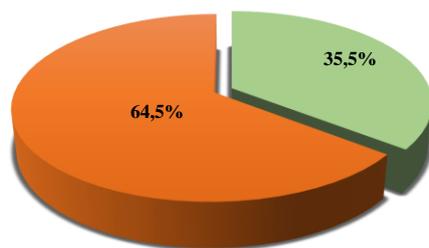
La fréquence d'isolement du pneumocoque est de 6,14% soit 31cas

Le nombre de cas indéterminé 236, composé de germes non pathogène et de culture stérile.

Le nombre de prélèvement reçu 505

### Caractéristiques sociodémographiques des patients

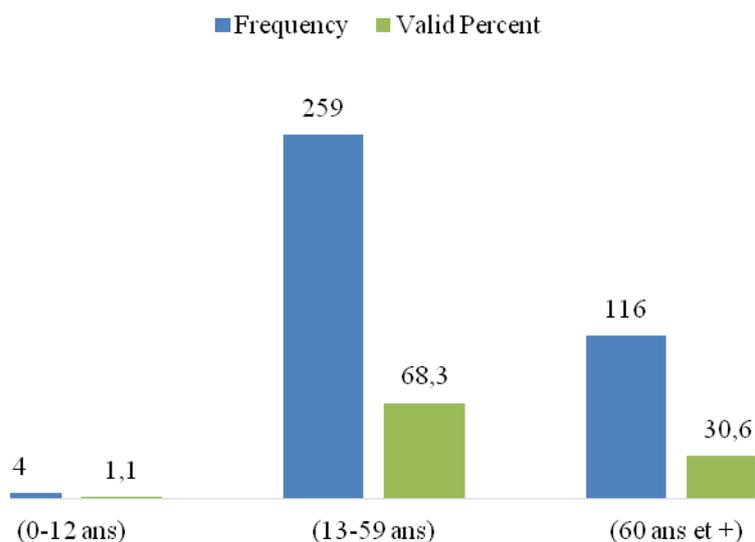
Les tableaux et figures suivants résument les caractères sociodémographiques de nos patients.



**F : 35,5%**    **M : 64,5%**

**Figure 8** : Répartition des patients selon le sexe.

En fonction du sexe, une dominance masculine (64,5%) a été observée dans notre série.



**Figure 9 :** Répartition des patients selon l'âge.

Parmi 31 patients, ceux âgés de 13-59 ans étaient les plus nombreux avec un pourcentage de 68,3%.

**Tableau II :** Répartition des patients selon leur provenance.

Provenance	Fréquence	Pourcentage
Centres de santé	9	29,0
Hôpitaux	22	71,0
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>

Près de  $\frac{3}{4}$  de nos prélèvements soient 71% provenaient des hôpitaux.

**Tableau III** : Répartition des prélèvements en fonction du mois.

Mois	Année			Total (%)
	2017	2018	2019	
Janvier	0 (0)	4 (12,9)	1 (3,2)	5
Février	0 (0)	<b>8 (25,6)</b>	0 (0)	8
Mars	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)	1
Avril	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)	3
Mai	0 (0)	1 (3,2)	0 (0)	1
Septembre	0 (0)	3 (9,7)	0 (0)	3
Novembre	1 (3,2)	3 (9,7)	0 (0)	4
Décembre	0 (0)	6 (19,4)	0 (0)	6
<b>Total</b>	<b>1 (3,2)</b>	<b>29 (93,5)</b>	<b>1 (3,2)</b>	<b>31 (100,0)</b>

Le mois de février 2018 a enregistré le plus grand nombre de prélèvements soit 25,6% sur l'ensemble.

**Tableau IV** : Répartition des patients selon leur profession.

Profession	Fréquence	Pourcentage
<b>Ouvriers</b>	<b>8</b>	<b>25,8</b>
Eleveur/Cultivateur	5	16,1
Ménagère	5	16,1
Commerçant	4	12,9
Elève/Etudiant	3	9,7
Enseignant	2	6,5
Militaire	1	3,2
Retraité	1	3,2
NR	2	6,5
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>

Les patients ouvriers étaient les plus représentés avec 25,8%.

### Caractéristiques cliniques et thérapeutiques

Les données cliniques et thérapeutiques des patients retenus sont résumées dans les légendes qui suivent.

**Tableau V** : Répartition des patients en fonction du traitement reçu avant l'examen.

Traitement	Fréquence	Pourcentage
Non	6	19,4
Oui	25	80,6
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>

Plus de 80,6% de nos sujets étaient sous traitement, avant la réalisation de leur prélèvement.

**Tableau VI** : Profil antibiotique des souches de *Streptococcus pneumoniae* face aux  $\beta$ -Lactamines.

	Pénicilline	Oxacilline	Céfotaxime	Amoxicilline
<b>Sensibles</b>	(3,0%)	(12,0%)	(32,0%)	(43,0%)
<b>Résistants</b>	(97,0%)	(88,0%)	(58,0%)	(57,0%)
<b>Total</b>	100,0	100,0	100,0	100,0

12% OXA-Sensible : Représente les souches de pneumocoque sensibles aux  $\beta$ -Lactamines

88% OXA-Résistant : Représente les souches de pneumocoque de sensibilité diminuée aux  $\beta$ -Lactamines auxquelles il faut déterminer les CMI en cas de traitement.

**Tableau VII:** Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* par rapport aux Macrolides.

	<b>Erytromycine</b>	<b>Pristinamycine</b>
<b>Sensibles</b>	(37,0%)	(94,0%)
<b>Résistants</b>	(63,0%)	(3,0%)
<b>Total</b>	100,0	97,0%

La pristinamycine est la molécule la plus active sur les souches de *S.pneumoniae*.

Toutes nos souches représentaient le phénotype MS.

**Tableau VIII:** Classification des différents phénotypes.

<b>Phénotypes</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
CTX <sup>s</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>s</sup> Nor <sup>s</sup> Tetra <sup>s</sup> Vanco <sup>s</sup>	1	5,0
CTX <sup>s</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>s</sup> Tetra <sup>r</sup> Vanco <sup>s</sup>	1	5,0
CTX <sup>s</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>r</sup> Tetra <sup>r</sup> Vanco <sup>r</sup>	1	5,0
CTX <sup>s</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>r</sup> Tetra <sup>r</sup> Vanco <sup>s</sup>	3	15,0
<b>CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup></b>	<b>7</b>	<b>35,0</b>
CTX <sup>r</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>r</sup> Tetra <sup>r</sup> Vanco <sup>r</sup>	3	15,0
CTX <sup>r</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>s</sup> Tetra <sup>r</sup> Vanco <sup>s</sup>	2	10,0
CTX <sup>r</sup> PTN <sup>s</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>r</sup> Tetra <sup>s</sup> Vanco <sup>s</sup>	1	5,0
CTX <sup>r</sup> PTN <sup>r</sup> STX <sup>r</sup> Nor <sup>s</sup> Tetra <sup>s</sup> Vanco <sup>r</sup>	1	5,0
<b>Cas indéterminé</b>	<b>11</b>	<b>35,0</b>
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>

35% des souches étaient de phénotype CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup>STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup>.

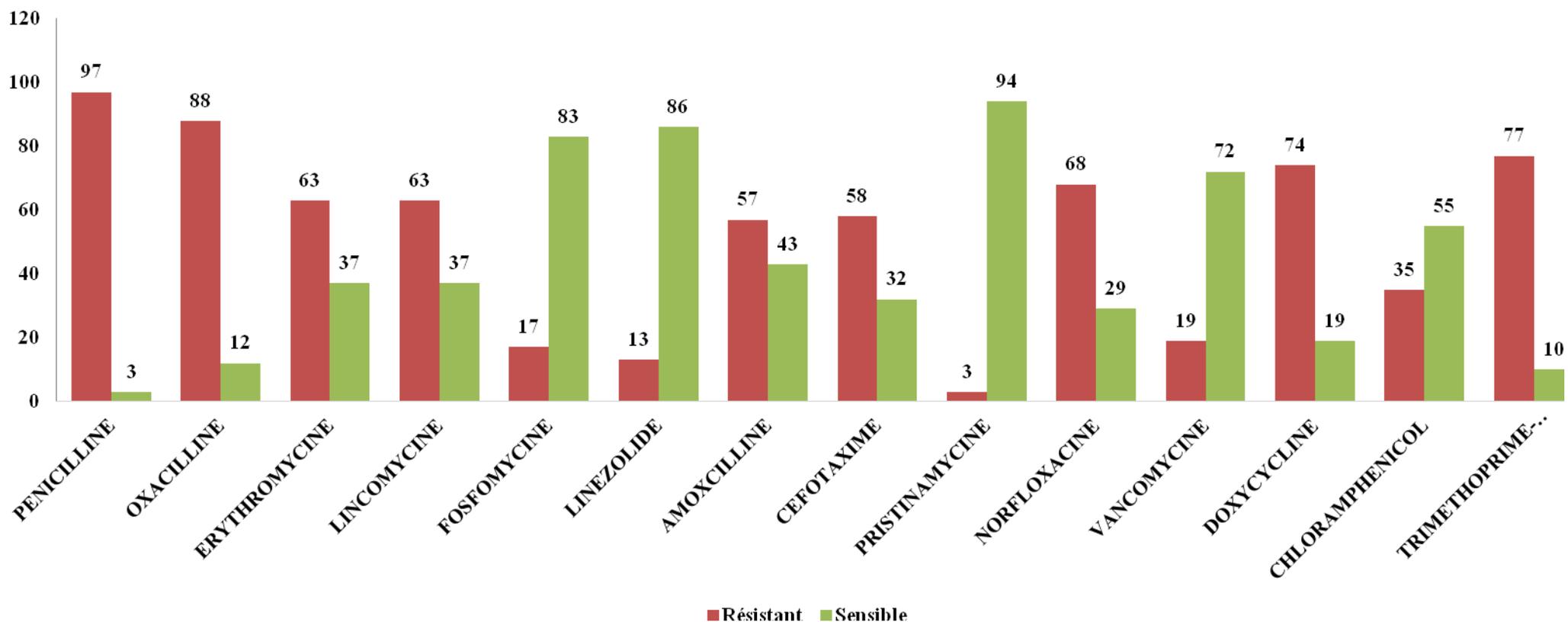
Cas indéterminé 35%, due à la rupture d'antibiotiques et à la perte des souches.

**Chapitre 2** Tableau IX : **Classification des souches selon le type de résistance.**

<b>Types de résistance</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentages</b>
Multi- résistance	13	41,9
Mono-résistance	18	58,1
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>100,0</b>

41,9% de nos souches étaient multi résistant et 58,1% de mono-résistance.

### Profil de résistance du pneumocoque aux antibiotiques



**Figure 10 :** Sensibilité et résistance des souches de pneumocoque aux antibiotiques.

Les taux de sensibilité les plus élevés des souches de pneumocoque aux antibiotiques ont concerné la pristinamycine (94%), linezolide (86%), la fosfomycine (83%), la vancomycine (72%).

Les taux de résistance les plus élevés des souches de pneumocoque aux antibiotiques ont concerné la pénicilline (97%), l'oxacilline (88%), le cotrimoxazole (77%).

## COMMENTAIRES ET DISCUSSION

### 1. Limite de l'étude

Transversale et prospective, notre étude a porté sur la détermination de la sensibilité de souches de *Streptococcus pneumoniae* vis-à-vis de certaines molécules d'antibiotiques de différentes familles.

Notre échantillonnage ayant porté sur des prélèvements de crachat, ne nous permet pas de couvrir toutes les pathologies dues au pneumocoque. Ce qui limite les types d'infections et donc de résistances qui pourraient être rencontrées.

Pour la détermination de la sensibilité des souches aux antibiotiques, nous avons réalisé des antibiogrammes suivant la méthode de diffusion sur gélose. Lors de cette étape nos résultats n'ont pas tenu compte de la concentration caractérisant le couple antibiotique/ bactérie, la CMI ce qui pouvait aider à comparer les valeurs en fonction des résistances naturelles et/ou acquises des molécules pour les molécules testées ; elle reste également un véritable atout dans le choix de l'antibiothérapie.

### 2. Caractéristiques sociodémographiques

#### *Données des patients*

Notre étude a fait le point sur le profil de sensibilité de 31 souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées chez 31 patients. Parmi ces derniers, 64,5% étaient de sexe masculin. Ce résultat est identique à celui de Mariam K. *et al.* qui ont obtenu 60% au cours d'une étude réalisée entre 2005 à 2006 sur l'incidence des infections à *Streptococcus pneumoniae* chez les enfants âgés de 12 à 23 mois à Bamako (56). Cependant, Pinosch a eu une prédominance masculine légèrement inférieure, avec 55% dans une étude de surveillance externe des infections respiratoires à *Streptococcus pneumoniae* en 2005 chez les enfants à Genève.

Dans tous les cas, la majorité des études, les infections à pneumocoque touchent plus d'hommes (57). La prédominance masculine dans notre étude pourrait s'expliquer par la présence de certains facteurs de risque chez cette population notamment le tabagisme et l'alcoolisme.

La tranche d'âge de 13 à 59 ans était prédominante avec un pourcentage de 68,3% tandis que celle de plus de 60 ans représentaient 30,6%. Le pneumocoque touche beaucoup plus les enfants de moins de 5ans et plus particulièrement ceux de moins de 2 ans (58) , cela concorde avec les résultats de Mariam K. *et al.*, qui ont montré que la tranche d'âge de 12-23mois était la plus touchée avec 60% des cas.

Ailleurs, Fatima B. *et al.*(Algérie 2017) ont trouvé une prévalence de 1,6 % et 0,7 % chez les enfants de moins de 2 ans et les personnes de plus de 60 ans, respectivement (4).

Le faible nombre de la tranche d'âge 0-12 ans dans notre série était du au fait que les prélèvements du service pédiatrie étaient prise en charge par le CVD-Gabriel Touré.

### **Prédominance saisonnière**

La prédominance pendant les mois de février (25,6%), décembre (19,4%) à janvier (12,9%) explique l'incidence maximale à la saison fraîche. Cette prévalence en période fraîche est notée dans la plupart des études épidémiologiques antérieures. En effet, SAMAKE T. *et al.* en 2003 au CVD- Gabriel Toure qui avait constaté une prédominance de *Streptococcus pneumoniae* en Février, Mars et Avril (59). De même KOUMARE B. *et al.* durant la période 1976-1991 ont également signalé une prédominance d'infections respiratoires à *Streptococcus pneumoniae* en Novembre, Décembre et Janvier à Bamako (60). Ailleurs, en Afrique du Sud, FELDMAN note une prédominance entre Juin et Septembre, époque correspondant à l'hiver austral (61).

Cette répartition saisonnière s'expliquerait en partie par une fréquente surinfection des gripes par le pneumocoque, entraînant donc lors des épidémies de grippe hivernale, une recrudescence des infections à pneumocoque (62).

### **Profil de sensibilité aux antibiotiques**

Le *Streptococcus.pneumoniae* a acquis, au cours des dernières décennies, des résistances à plusieurs antibiotiques qui ne cessent d'augmenter (63).

L'antibiogramme est devenu indispensable en raison de l'importance croissante des PSDP et des pneumocoques multi-résistants. Nous avons testé la sensibilité aux antibiotiques par la méthode des disques sur la gélose de Mueller-Hinton additionné de 20 mg/L  $\beta$ -NAD + 5% sang de cheval défibriné (MH-F). L'interprétation des diamètres d'inhibition a été faite selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM 2018).

Quelques phénotypes évidents se dégagent CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup> soit 35%, CTX<sup>s</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup> et CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>r</sup> soient 15%, et 10% pour CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>s</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup>.

La majorité de nos souches (88%) présentait une sensibilité diminuée au  $\beta$ -Lactamines . Elles présentaient également une résistance à la doxycycline (74%), suivie du cotrimoxazole (77%), de la norfloxacine (68%), de l'érythromycine (63%) et du ceftriaxone (58%). Ces résultats sont en contraste avec ceux de KAMATE *et al.*, à Bamako, au cours de la période 2015 2017 ont constaté une sensibilité diminué de 60% aux  $\beta$ -Lactamines de *Streptococcus pneumoniae*, et une résistance de (66,67%) à l'érythromycine, (100%) à la tétracycline au et cotrimoxazole,

et (0%) à la pristinamycine et au céfotaxime (64). En 2004 au Québec, BOLDUC a aussi trouvé un taux de résistance de 28% à l'érythromycine (65) ; ce qui est inférieur au nôtre.

Par ailleurs en 2017 Mina S.*et al* ont trouvé une résistance de 96% pour l'amoxicilline, 87,3% pour l'érythromycine, 77,6% pour la tétracycline, et 72,8% pour le céfuroxime.

Dans le rapport d'activité de 2016 du CNRP, 10 souches de pneumocoque présentaient un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones, soit 3% des pneumocoques isolées de prélèvements respiratoires chez l'adulte en 2015, ce résultat est très inférieur à nos résultats(66).

Ailleurs nous avons trouvé une forte sensibilité du pneumocoque à la pristinamycine (94%) suivie du linezolide (86%) de la fosfomycine (83%) et de la vancomycine (72%).

La multi résistance, définie chez le pneumocoque par la résistance à au moins 3 familles d'antibiotiques, concernait près de 41,9 % de l'ensemble des souches étudiées. La majorité des souches multi résistantes étaient à la fois de sensibilité diminuée à la pénicilline, résistantes aux macrolides et aux quinolones.

## **Conclusion**

La présente étude qui portait sur la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* a été réalisée pendant une année au laboratoire de l'INRSP de Bamako.

Au terme de cette étude nous pouvons conclure que *Streptococcus pneumoniae* a été isolé d'expectoration à une fréquence de 6,14%.

La fréquence du phénotype multi résistant était de 41,9% et celle de la sensibilité diminuée à la pénicilline était de 88%.

Les pneumocoques isolés dans cette étude présentaient une résistance élevée aux antibiotiques disponibles sur le marché malien et moins coûteux à savoir : Ampicilline (57%), Erythromycine (63%) et Oxacilline (88%). Ces derniers constituent aussi les antibiotiques de choix pour le traitement des infections à *Streptococcus pneumoniae* (56). Cette résistance observée rend la démarche thérapeutique difficile.

La majorité des souches, 71% nous venaient des hôpitaux et 29% des centres de santé.

A la lumière de ces résultats, cette résistance inciterait à demander l'antibiogramme avant toute prescription d'antibiotique plus précisément pour la pénicilline devant les cas d'infections respiratoires.

## **Recommandations**

A l'issue de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

### **Aux autorités sanitaires :**

Renforcer la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

Rendre les moyens disponibles pour la réalisation des tests de CMI en routine.

### **A l'INRS**

Améliorer le système d'approvisionnement, afin d'éviter les ruptures de réactifs.

Renforcer la chaîne de froid, pour mieux conserver les échantillons destinés à être utilisés pour des études ultérieures.

Et en fin améliorer les équipements de diagnostic des laboratoires afin d'obtenir des résultats performants.

### **Aux partenaires techniques et financiers**

Appuyer la surveillance de la résistance aux antibiotiques par :

Le renforcement des ressources humaines qualifiées pour la réalisation des tests de CMI.

La disponibilité des réactifs

### **Aux cliniciens**

Faire une recommandation pour le choix des antibiotiques en traitement probabiliste des infections respiratoires avec suspicion de pneumocoque.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017;57(13):2857-76.
2. Goulenok T. Vaccination anti-pneumococcique chez l'adulte: comment améliorer la couverture vaccinale? *Journal des Anti-infectieux*. 2014;16(2):89-98.
3. Y M. Morin Y. Larousse de médecine. 2001;Larousse de médecine, version 2001:P886.
4. Boukind MF. Bacteriemie a streptococcus pneumoniae: Universite mohammed v faculte de medecine et de pharmacie -Rabat-; : 2008
5. ; Available from: [http : // www.bacterio.cit.fr/bacdico/ss/pneumoniae.html](http://www.bacterio.cit.fr/bacdico/ss/pneumoniae.html) .
6. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique: Ellipses Edition Marketing SA; 2000.
7. Brisou P CJ-M, Gaillard T, Muzellec Y. Infections à pneumocoque. *E. M.C.*, 2010, 4 :260(B)-10.
8. P. FFJ. Bactériologie Médicale. . Collection Azay. 1997: p115-7.
9. Berved MZ. Aspects épidémiologiques de la méningite a streptococcus pneumoniae au mali du 1er janvier 1998 au 31 decembre 2004 a propos de 321 cas . these. 07/01/2006.
10. Schleifer K, Kilpper-Bälz R. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Systematic and Applied Microbiology*. 1987;10(1):1-19.
11. Bentley RW, Leigh JA, Collins MD. Intrageneric structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1991;41(4):487-94.
12. Hardie J, Whiley R. Recent developments in streptococcal taxonomy: their relation to infections. *Reviews in Medical Microbiology*. 1994;5(3):151-62.
13. Schlegel L, Bouvet A. Streptocoques et genres apparentés: abiotrophes et entérocoques. *Bull Soc Fr Microbiol*. 1998;13:7-17.
14. Avril J, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique 3ème édition. Ellipses édition marketing SA Paris. 2000:171-229.
15. Mouton. Y BM. Infections à pneumocoque. *Encyclopédie Médico -Chirurgicale Paris, Maladies Infectieuses*, 5-1979. p. p1-3.
16. Berche P, Gaillard J-L, Simonet M. Bactériologie: bactéries des infections humaines: Flammarion médecine-sciences; 1988.
17. Varon E, Gutmann L. Epidémiologie 2006. Centre National de Référence des Pneumocoques Rapport d'activité. 2007:3-84.
18. Marcel J. L'antibiogramme et son impact médical. *Antibiotiques*. 2005;7(1):53-8.
19. Williams RJ. Globalization of antimicrobial resistance: epidemiological challenges. *Clinical infectious diseases*. 2001;33(Supplement\_3):S116-S7.
20. Douthwaite S, Champney WS. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(90002):1-8.
21. Draghi D, Jones M, Sahm D, Tillotson G. Geographically-based evaluation of multidrug resistance trends among *Streptococcus pneumoniae* in the USA: findings of the FAST surveillance initiative (2003–2004). *International journal of antimicrobial agents*. 2006;28(6):525-31.
22. Vergnaud M, Bourdon S, Brun M, Cattier B, Chanal C, Chardon H, et al. Observatoires régionaux du pneumocoque: analyse de la résistance aux antibiotiques et des sérotypes de *Streptococcus pneumoniae* en 2001. *BEH*. 2003;37:173-6.

23. biologiques Cours de Bactériologie Générale Available from: <http://microbes.edu.com/etudiant/streptoques.html>.
24. streptocoque pneumoniae. consulté le 31 mai 2017; Available from: <http://medkey.eklablog.com/chlamydia-pneumoniae-c23619317>.
25. Gélose au sang frais ANC (Acide Nalidixique Colistine). consulté le 31 mai 2017 Available from: <http://www.microbiologiemedicale.fr/milieuxdisolement/selectifs/gram+/sangfraisanc.htm>, .
26. Coulibaly CA. Arthrite septique à Streptococcus pneumoniae chez l'Adulte: A propos d'un cas 2014.
27. M DS, Tunis LdM-HCNd. Streptococcus pneumoniae: Rappels Bactériologiques & État actuel de la sensibilité aux antibiotiques 30 Juin 2010.
28. Rieux V. Les facteurs de virulence de Streptococcus pneumoniae. Médecine et Maladies Infectieuses. 2002;32:1-12.
29. Watson D, Musher D, Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 1995;14(6):479-90.
30. Pesola GR. The urinary antigen test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Chest. 2001;119(1):9-11.
31. Bingen É. Physiopathologie des infections à pneumocoque en pédiatrie. Médecine thérapeutique/Pédiatrie. 2005;8(4):248-54.
32. Bingen E. Place du pneumocoque en pathologie infectieuse pédiatrique. Pathologie Biologie. 2002;50(6):374-9.
33. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, et al. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae. Molecular microbiology. 1997;25(5):819-29.
34. Scanlon KL DW, Glex RH. Purification and properties of Streptococcus pneumoniae neuraminidase. Enzyme. 1989;41 : 143-50.
35. Koedel U, Scheld WM, Pfister H-W. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. The Lancet infectious diseases. 2002;2(12):721-36.
36. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65(2):187-207.
37. Morris G, Berk M, Galecki P, Walder K, Maes M. The neuro-immune pathophysiology of central and peripheral fatigue in systemic immune-inflammatory and neuro-immune diseases. Molecular neurobiology. 2016;53(2):1195-219.
38. E B. Physiopathologie des infections à pneumocoque en pédiatrie. Méd Thérap /Pédiat. 2005:248-54.
39. B. SPF. Les vaccinations dans les pays en développement, Marseille 7, 8 et 9 octobre 2015 Bull. Soc. Pathol. Exot. XXIes Actualités du Pharo 2015 –. 2016:109:51-60.
40. Brisou P CJ-M, Gaillard T, Muzellec Y. Infections à pneumocoque. E MC. 2010,.
41. Boukhari E. La résistance bactérienne aux antibiotiques: Université Mohamed BOUDIAF de M'Sila; 2010.
42. Cattoir V. Courvalain P LR, Bingen E. Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymyxines. In : Antibiogramme. 2ème édition, . 2006 P349-64.
43. Iazzouguen A, Ouatah N, Oukil NE. Effet de l'association de l'huile essentielle de Thymus algeriensis (Bois et Reut) et de deux antibiotiques (ampicilline et céfazoline) sur Escherichia coli et Staphylococcus aureus. 2012.
44. Lango-Yaya E, Djeintote M, Djimeli C. Contribution to the Study of Antibiotic Resistance on Salmonella and Shigella Strains Isolated in Central African Republic. J Microbiol Exp. 2017;4(1):00105.

45. 12. Yala D. MAS, Mohamedi D., Ouar–Korichi M.N. Médecine du Maghreb. n°91. 2001:p5-12.
46. T RCeM. Glycopeptides. In: Chir EM, editor. Maladies infectieuses2007. p. 7 p.
47. Leclercq.R Courvalain P. LR, Bingen E. Macrolides-lincosamides-streptogramines In : Antibiogramme 2ème édition. 2006::P299-324.
48. Bahri M, ZaouI F. Exploration des infections bactériennes au niveau du service de néphrologie du chu de tlemcen d’octobre 2016 jusqu'a avril 2017.
49. Poyart C.Courvalain.P LR, Bingen.E. Tétracyclines. In : antibiogramme 2ème édition. 2006:P325-34.
50. Goldstein F.Courvalain.P LR, Bingen.E. Sulfamides et triméthoprim In : antibiogramme. 2ème édition. 2006 P341-8.
51. Guardabassi L, Courvalin P. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin: American Society of Microbiology; 2006. p. 1-18.
52. Saliou P. XXI es Actualités du Pharo 2015–Les vaccinations dans les pays en développement Marseille 7, 8 et 9 octobre 2015. Bulletin de la Société de pathologie exotique. 2016;109(1):51-60.
53. Gutmann EVL. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des pneumocoques. Rev Med Suisse. 2004:23719.
54. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. In vitro activity of telithromycin against Streptococcus pneumoniae resistant to other antibiotics, including cefotaxime. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2002;49(2):399-401.
55. Hitouche T, Idjer F. Etude de la résistance aux macrolides et tétracyclines chez Staphylococcus aureus isolé de différentes origines. 2017.
56. Konate M. Incidence des infections à Streptococcus pneumoniae chez les enfants traités en ambulatoire dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré de juin 2005 à mai 2006: Université de BAMAKO; 2006- 2007.
57. Mouton. Y BM. Infections à pneumocoque. In: Paris EM-C, editor. Maladies Infectieuses5-1979. p. p1-3.
58. Plyer J F CF. Actualités des pneumococcies [Thèse Doct. Méd]1988,.
59. T S. Pratique de l’examen cyto bactériologique du LCR au laboratoire d’analyse médicales de l’Hopital Gabriel Toure : aspect méthodologique [Thèse Pharm]2004.
60. Koumare. B BF, Cisse. M, Doumbia. T,, M.M K. Aspects bactériologiques des méningites purulentes dans le district de Bamako. Bull. Soc. Exo 1993.
61. Feldman C. SH, Levy H. et coll. Pneumococcal bacteremia in adults in a low socioeconomic urban population. Q J Med. 1988:69: 961-71.
62. Varon E. GL. Centre National de Référence des Pneumocoques, Rapport d'activité 2007. 2007.
63. Satli MM. Etude du portage rhinopharyngé du pneumocoque chez les nourrissons ayant une OMA à Marrakech 2017.
64. Kamate MH. Contribution à la surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de Streptococcus pneumoniae isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à Bamako au Mali. 2015 2017.
65. Novembre 2005; contact-vol.12 n°4:[Available from: [http: // www.rrsss12.gouv.qc.ca / documents / bulletin](http://www.rrsss12.gouv.qc.ca/documents/bulletin).
66. Varon E. CJ. le rapport d’activité de 2016

## **ANNEXES**

### **PROTOCOLE DE TRAITEMENT DE L'EXPECTORATION AU LABORATOIRE**

#### **Objet et Contexte**

Le diagnostic de l'agent causal de la pneumonie n'est pas simple. Les échantillons des voies respiratoires inférieures comme les expectorations spontanées induites sont fréquemment contaminés par la flore oropharyngée et plusieurs organismes sont capables de portage ou de pathogénicité. Il peut être difficile de déterminer quel est l'agent pathogène parmi les nombreux organismes présents dans l'échantillon. L'évaluation des Gram est effectuée pour s'assurer que les échantillons de crachats trop contaminés sont identifiés, de prévoir le résultat de la culture et d'aider à l'interprétation des résultats de la culture. L'utilisation de cultures sélective et non sélective est nécessaire pour sélectionner d'éventuels agents pathogènes de la flore normale. Les échantillons respiratoires doivent être transportés immédiatement au laboratoire car même un temps modéré à température ambiante peut entraîner la poussée de contaminants. Le stockage dans un réfrigérateur peut entraîner la perte d'agents infectieux sensibles à la température tel que *Streptococcus pneumoniae*.

L'objectif de ce SOP est de donner des orientations sur l'isolement et l'identification des organismes présents dans les échantillons respiratoires, en particulier les organismes suivants en tant que potentiels agents pathogènes de la pneumonie

- *Streptococcus pneumoniae*

#### **Cadre et Applicabilités**

Ce SOP est applicable à tout le personnel de laboratoire impliqué dans le traitement des échantillons au laboratoire.

#### **Rôles et responsabilités**

Site spécifique

#### **Echantillon**

Expectorations induites et expectoration

#### **Pré-requis et matériels**

Equipements

Incubateur 5% CO<sub>2</sub> à 37° C

Incubateur aérobique, ou 3,5L jar d'incubation et kit de générateur de gaz pour les laboratoires qui n'ont pas ces incubateurs.

Congélateur – 80° C

Congélateur – 20° C

1,5 micro-litre- boîtes de culture stérile jetable

Microscope

Cabinet de biosécurité

Boite pour conserver les lames, identifiée en fonction des jours de la semaine.

### **Matériels**

Anse en platine

Flacons à vis pour congélation

Bec Bunsen

Huile à immersion

Lame microscopique

Anse stérile jetable

Pipette Pasteur stérile jetable

Gélose au sang

Gélose chocolat (Bacitracine sang chauffé)

Gélose Mac Conkey + cristal violet

10 IU bacitracine disques

### **Sécurité et Evaluation des risques**

Toutes les expectorations, expectoration induite, échantillon d'aspiration ou liquides respiratoires doivent être traités dans un cabinet bio Hazard.

EPI approprié doit être porté par les techniciens de laboratoire.

### **Procédures**

Prétraitement d'échantillon (manipulation)

Traiter l'échantillon immédiatement à l'arrivée au laboratoire. Si l'échantillon peut-être traité immédiatement après prélèvement conserver à 4°C pour un maximum de 24 heures.

Préparation des frottis et coloration de Gram

En utilisant un écouvillon stérile, faire un frottis sur une lame de verre sec, propre identifiée en utilisant la portion la plus purulente de l'échantillon. Le frottis ne doit pas être si épais qu'il est difficile de lire après avoir été coloré, mais pas si mince au risque de perdre les agents pathogènes.

L'échantillon placé sur la lame a coloré est séché à l'air dans le cabinet de biosécurité et fixé ensuite à la chaleur.

Faire une coloration de Gram

Utiliser le système de classement Bartlett pour évaluer la quantité de l'expectoration, en évaluant le nombre de cellules épithéliales squameuses et des neutrophiles représentés par

champ à faible grossissement. Lire les résultats de coloration de Gram, d'observation à fort grossissement.

Le jour suivant comparez avec les résultats de culture.

Ne pas rejeter les échantillons en raison du score Bartlett. Tous les échantillons doivent être mis en culture et les résultats sont enregistrés.

Conserver les lames de coloration Gram dans de coloration dans une boîte à lames dans l'ordre chronologique (ne pas jeter).

Procédure de la culture

Les échantillons respiratoires liquides doivent être traités dès que possible après le prélèvement.

S'assurer que tous les échantillons d'inoculation sont disponibles dans le cabinet de sécurité biologique ; anse en plastique jetable, les milieux de culture nécessaire, lames, flacons d'aliquotage etc.

Choisissez les milieux appropriés (BA, MAC et CHO (or BHB)).

Les milieux à ensemercer doivent être étiquetés indiquant le numéro d'identification de l'échantillon (ID) et la date d'inoculation.

Ensemencer les milieux avec une goutte de l'expectoration induite ou liquide d'aspiration en utilisant la portion la plus purulente de l'échantillon et étaler en utilisant la méthode de quatre quadrants. Assurer vous qu'une portion de la partie purulente est réservée pour la culture de la recherche de Mycobactéries. Il est important d'utiliser une méthode standardisée d'étalage parce que cela va aider à l'interprétation des résultats de la culture.

Utiliser toujours le milieu pour chaque échantillon sans tourner l'anse.

Si la gélose chocolat est utilisé, placer un disque de 10 UI bacitracine sur le deuxième quadrant de la gélose chocolat. Cela empêche la plupart des

OPF (il n'est pas nécessaire de le faire si la gélose BHB est utilisée)

Pour les sites qui effectuent des tests pour le PCP, une déclaration est nécessaire et doit être insérée ici].

Après que la coloration de Gram est effectuée et les boîtes de culture ont été inoculées, faire aliquots suivants dans des boîtes stériles étiquetées : Les boîtes de culture sont examinées à 24 heures et 48 heures.

**NOTE** comparer les résultats de la coloration Gram aux résultats de la culture est une excellente méthode pour le suivi interne d'assurance qualité

## **EXAMEN DE LA CULTURE :**

### **Jour 1**

Examinez chaque milieu de culture pour une croissance importante,

D'écrire, compter et enregistrer la morphologie des colonies, et quantifier les morphotypes différents en fonction de leur répartition de croissance le long des lignes d'ensemencement par exemple une croissance limitée (scanty) sur la 1ère série de lignes, 1+ la croissance sur la 2ème série de lignes, une croissance de 2+ dans la mesure de la 3ème série de lignes croissance 3+ sur la 4ème série de lignes.

Purifier les organismes soupçonnés être importants.

Procéder à la coloration de Gram et l'identification et la sensibilité aux antibiotiques et des agents pathogènes importants.

En cas de doute s'il faut identifier ou signaler un isolat particulier, rapporter sa quantité relative sur la boîte originale, faire une boîte de pureté ou congeler, discuter avec un microbiologiste Cli/scientific senior. Tout organisme prédominant dans les expectorations, doit être considéré comme un pathogène potentiel,

Décrire la croissance mixte de bactéries pathogène respiratoires sans prédominance de potentiel pathogènes dans la coloration de Gram comme « flore oropharyngée » (OPF) scanty /1+/2+/3+, en utilisant la zone de croissance maximale pour décrire la quantité.

S'il n'y a pas croissance après 24h, incubé à nouveau pendant 24h.

Comparer les boîtes de culture avec les expectorations d'origine ou frottis de liquide d'aspiration par la coloration de Gram.

### **Jour 2.**

Examiner les milieux réincubés, si aucune croissance après 48 Heures reporter comme pas de croissance.

Observer et décrire la morphologie des colonies, la taille et la topographie des milieux réincubés et le milieu de pureté, s'il y a une croissance mixte.

Faire la coloration de Gram et l'identification à partir des milieux précédemment purifiés.

Effectuer les tests de sensibilité aux antibiotiques sur tous les organismes importants selon les directives du CLSI.

Une fois l'identification de l'organisme et la sensibilité aux antibiotiques ont été lues. Les résultats sont entrés dans la base de données.

Enregistrer les grades Bartlett et le score total, la quantification à partir de la coloration de Gram de toutes les bactéries potentiellement pathogènes et la OPF, les résultats des tests de sensibilité pour les isolats pathogènes et les positions de tous les isolats congelés. Ne pas

Ne passez pas trop de temps à contrôler les isolats de *Streptococcus pneumoniae* à la recherche de morphotypes différents, mais s'il y a deux morphotypes très clairs, congeler un seul ou il existe clairement une prédominance. S'ils sont tous deux présents dans la même quantité et évidemment différents morphotypes, congeler les séparer.

### **Gestion des données**

Accès, Emplacement et la conservation des dossiers relatifs à la SOP spécifique au site.

### **Assurance Qualité Contrôle Qualité**

La formation initiale et l'évaluation des compétences de tout le

Personnel approprié dans ce SOP.

La formation de recyclage périodique et observation par le personnel de laboratoire.

Un sur dix (10%) des frottis de Gram seront examinés par un deuxième technicien principal/scientifique.

La surveillance continue des reports.

### **Matériels et réactifs utilisés**

Disque d'Optochine (P)

Gélose au sang

Anse

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

- solution saline stérile à 0,85 % ;

- standard 0,5 de Mc Ferland ;

- disques d'antibiotiques pour test de sensibilité ;

- écouvillons en coton stérile ;

- pipettes à sérum ;

- pinces à disques et/ ou applicateurs de disque.

Anse en platine

Flacons à vis pour congélation

Bec Bunsen

Huile à immersion

Lame microscopique

Anse stérile jetable

Pipette Pasteur stérile jetable

Gélose au sang

Gélose chocolat (Bacitracine sang chauffé)

Gélose Mac Conkey + cristal violet

10 IU Bacitracine disques

- microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100 ;
- huile à immersion ;
- coffret de colorants de Gram contenant :
  - violet de gentiane ou cristal violet ;
  - solution de lugol ;
  - solution de décolorant alcool acétone ;
  - safranine ou fuchsine basique ;
- lames porte-objet ;
- portoir de lame ;
- crayon de papier ;
- papier buvard ;
- flacon d'eau distillée ;
- bac de coloration.

## Fiche signalétique

**Nom :** Maïga

**Prénom :** Houssenatou

**Tel :** 79 03 61 76

**Email :** sanghousse@gmail.com

**Titre :** Sensibilité aux antibiotiques usuels des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées dans les expectorations au laboratoire de bactériologie de l'INRSP à Bamako.

**Année académique :** 2018-2019

**Ville de soutenance :** Bamako

**Pays d'origine :** Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la FMOS/FAPH et du CHUOS

**Secteur d'intérêt :** Bactériologie

### Résumé :

**Introduction :** Les infections à pneumocoques sont dues à une bactérie appelée *Streptococcus pneumoniae*. Les pneumocoques peuvent être responsables d'infections dans de nombreuses localisations du corps. *S. pneumoniae* est le principal agent étiologique des pneumonies aiguës communautaires. L'antibiorésistance est favorisée par l'utilisation large et parfois inappropriée des antibiotiques.

**Objectif :** Evaluer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. pneumoniae* isolées dans les prélèvements d'expectoration dans le service de bactériologie de l'INRSP.

**Matériel et méthodes :** Il s'agissait d'une étude prospective à visée descriptive qui a porté sur la détermination de la sensibilité de souches de *Streptococcus pneumoniae* vis-à-vis de certaines molécules d'antibiotiques de différentes familles de novembre 2017 à janvier 2019 dans le service de bactériologie virologie de l'Institut National de Recherche en santé publique de Bamako.

**Résultats :** Notre étude a porté sur un échantillon de 31 prélèvements, avec un sex-ratio 1,5 en faveur du sexe masculin. Les ouvriers et patients d'âge compris entre 13 et 59 ans avec respectivement 25,8% et 68,3% étaient les plus représentés. 35% des souches étaient de phénotype CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup>STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup>. La mono-résistance avec 58,1% était le type de résistance le plus rencontré contre 41,9% de multi résistance, la fréquence d'isolement du pneumocoque est de 6,14%. Les taux de sensibilité les plus élevés des souches de

pneumocoque aux antibiotiques ont concerné la pristinamycine (94%), linezolide (86%), la fosfomycine (83%), la vancomycine (72%).

**Conclusion :** Le *Streptococcus pneumoniae* a été isolé d'expectoration à une fréquence de 6,14%. La fréquence du phénotype multi résistant était de 41,9% et celle de la sensibilité diminuée à la pénicilline était de 88% et les pneumocoques isolés présentaient une résistance élevée à l'Ampicilline (57%), l'Erythromycine (63%) et l'Oxacilline (88%)

**Mots clés :** **sensibilité, de *Streptococcus pneumoniae*, résistance**

## Summary

**Introduction:** Pneumococcal infections are caused by bacteria called *Streptococcus pneumoniae*. Pneumococci can be responsible for infections in many areas of the body.

*S.pneumoniae* is the main etiological agent of acute community acquired pneumoniae antibiotic resistance is favored by the wide and sometimes inappropriate use of antibiotics.

**Objective:** To evaluate the antibiotic sensitivity profile of *S.pneumoniae* strains isolated in sputum samples in the INRSP bacteriology departement.

**Material and methods:** this was a prospective descriptive study which focused on the detection of the sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* strains with respect to certain antibiotic molecules from different families from november 2017 to january 2019 in the service of bacteriology virology of the National Institute of Research in Health of Bamako.

**Resume:**

Our study focused on a sample of 31 samples with a sex ratio 1,5 in favor of male. The workers and age patients between 13 and 59 years with respectively 25,8% and 68,3% were the most represented 35% of the strains were phenototype CTX<sup>r</sup> PTN<sup>s</sup> STX<sup>r</sup> Nor<sup>r</sup> Tetra<sup>r</sup> Vanco<sup>s</sup>.

The mono resistance with 58,1% was the most respected type of resistance against 41,9% of multi-resistance, the isolate frequency of the tire isolate of 6,14%. The highest sensitivity rates of the strains of pneumococci to antibiotics affected pristinamycin (94%), linentimide (86%), fosfomycin (83%), vancomycin (72%).

**Conclusion:** The *Streptococcus pneumoniae* was isolated from expelration at a frequency of 6,14%. The frequency of the multi-resistant phenotype was 41,9% and that of the sensitivity

decreased to the penicillin was 88% and isolated pneumocoks had present high resistance ampicillin (57%), erythromycin (63%) and oxacillin (88%).

## **SERMENT DE GALIEN**

- *Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.*
- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement*
- *D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*

***Je le jure !***