

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE

UNIVERSITE DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE  
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple – Un But – Une Foi

ANNEE UNIVERSITAIRE 2003 – 2004

N° 6.1

**PRATIQUE DE L'HEMOCULTURE AU  
LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES DE  
L'HOPITAL GABRIEL TOURE  
ASPECTS METHODOLOGIQUES**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 22 / 11 / 2003  
Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par Mariam SAMAKE

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

**JURY**

Président du Jury :

Professeur Amadou DIALLO

Membre :

Docteur KEITA Tatiana

Co-directeur de thèse :

Docteur Souleymane DIALLO

Directeur de thèse :

Professeur Flabou BOUGOUDOOGO

MINISTRE DE L'EDUCATION NATIONALE

UNIVERSITE DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE  
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

REPUBLIQUE DU MALI  
Un Peuple – Un But – Une Foi

ANNEE UNIVERSITAIRE 2003 – 2004

N° \_\_\_\_\_

**PRATIQUE DE L'HEMOCULTURE AU  
LABORATOIRE D'ANALYSES MEDICALES DE  
L'HOPITAL GABRIEL TOURE  
ASPECTS METHODOLOGIQUES**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 22 / 11 / 2003  
Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par Mariam SAMAKE

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

**JURY**

Président du Jury :

Professeur Amadou DIALLO

Membre :

Docteur KEITA Tatiana

Co-directeur de thèse :

Docteur Souleymane DIALLO

Directeur de thèse :

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

**FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE**  
**ANNEE UNIVERSITAIRE 2002 - 2003**

**ADMINISTRATION**

DOYEN : MOUSSA TRAORE - PROFESSEUR

1<sup>ER</sup> ASSESSEUR : MASSA SANOGO - MAITRE DE CONFERENCES

2<sup>EME</sup> ASSESSEUR : GANGALY DIALLO - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

SECRETAIRE PRINCIPAL : YENIMEGUE ALBERT DEMBELE - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

AGENT COMPTABLE : MADAME FATOUMATA TALL - CONTROLEUR OES FINANCES

**LES PROFESSEURS HONORAIRES**

Mr Alou BA	Ophthalmologie
Mr Bocar SALL	Orthopédie Traumatologie - Secourisme
Mr Souleymane SANGARE	Pneumo-phthysiologie
Mr Yaya FOFANA	Hématologie
Mr Mamadou L. TRAORE	Chirurgie Générale
Mr Balla COULIBALY	Pédiatrie
Mr Mamadou DEMBELE	Chirurgie Générale
Mr Mamadou KOUMARE	Pharmacognosie
Mr Mohamed TOURE	Pédiatrie
Mr Ali Nouhoum DIALLO	Médecine interne
Mr Aly GUINDO	Gastro-Entérologie

**LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE**

**D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES**

**1. PROFESSEURS**

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique

**2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale

**3. MAITRES DE CONFERENCES**

Mme SY Aïda SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique

**4. MAITRES ASSISTANTS**

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE	Gynéco-Obstétrique
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale
Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Issa DIARRA	Gynéco-obstétrique

## 5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mr Mamadou L. DIOMBANA  
Mr Sékou SIDIBE  
Mr Abdoulaye DIALLO  
Mr Tiéman COULIBALY  
Mme TRAORE J. THOMAS  
Mr Nouhoum ONGOIBA  
Mr Zanafon OUATTARA  
Mr Zimogo Zié SANOGO  
Mr Adama SANGARE  
Mr Youssouf COULIBALY  
Mr Samba Karim TIMBO  
Mme TOGOLA Fanta KONIPO  
Mr Sanoussi BAMANI  
Mr Doulaye SACKO  
Mr Ibrahim ALWATA

Stomatologie  
Orthopédie. Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
Orthopédie Traumatologie  
Ophtalmologie  
Anatomie & Chirurgie Générale  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Orthopédie - Traumatologie  
Anesthésie - Réanimation  
ORL  
ORL  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Orthopédie - Traumatologie

## D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO  
Mr Bréhima KOUMARE  
Mr Siné BAYO  
Mr Yéya T. TOURE  
Mr Amadou DIALLO  
Mr Moussa HARAMA  
Mr Ogobara DOUMBO

Chimie Générale & Minérale  
Bactériologie-Virologie  
Anatomie-Pathologie-Histoembryologie  
Biologie  
Biologie  
Chimie Organique  
Parasitologie - Mycologie Chef de D.E.R.

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Yénimégué Albert DEMBELE  
Mr Anatole TOUNKARA  
Mr Amadou TOURE  
Mr. Flabou Bougoudogo

Chimie Organique  
Immunologie  
Histoembryologie  
Bactériologie-Virologie

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE  
Mr Abdourahamane S. MAIGA  
Mr Adama DIARRA  
Mr Mamadou KONE  
Mr. Massa SANOGO

Biochimie  
Parasitologie  
Physiologie  
Physiologie  
Chimie Analytique

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE  
Mr Sékou F.M. TRAORE  
Mr Abdoulaye DABO  
Mr Abdourahamane S. MAIGA  
Mr Ibrahim I. MAIGA  
Mr Moussa Issa DIARRA  
Mr Amagana DOLO  
Mr Kaourou DOUCOURE

Biologie  
Entomologie médicale  
Malacologie, Biologie Animale  
Biochimie  
Bactériologie - Virologie  
Biophysique  
Parasitologie  
Biologie

## 5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY Hématologie  
Mr Mahamadou A. THERA Parasitologie

## D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

### 1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY Médecine Interne  
Mr Mamadou K. TOURE Cardiologie  
Mr Mahamane MAIGA Néphrologie  
Mr Baba KOUMARE Psychiatrie, Chef de DER  
Mr Moussa TRAORE Neurologie  
Mr Issa TRAORE Radiologie  
Mr Mamadou M. KEITA Pédiatrie  
Mr Hamar A. TRAORE Médecine Interne  
Mr Dapa Aly DIALLO Hématologie

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE Pédiatrie  
Mr Bah KEITA Pneumo-Phtisiologie  
Mr Boubacar DIALLO Cardiologie  
Mr Somita KEITA Dermato-Leprologie  
Mr Moussa Y. MAIGA Gastro-entérologie  
Mr Abdel Kader TRAORE Médecine Interne  
Mr Siaka SIDIBE Radiologie

### 3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamadou DEMBELE. Médecine Interne  
Mr Mamady KANE Radiologie  
Mme Tatiana KEITA Pédiatrie  
Mr Diankiné KAYENTAO † Pneumo-Phtisiologie  
Mme TRAORE Mariam SYLLA Pédiatrie  
Mr Adama D. KEITA Radiologie  
Mme SIDIBE Assa TRAORE Endocrinologie  
Mme Habibatou DIAWARA Dermatologie

### 4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE Psychiatrie  
Mr Bougouzié SANOGO Gastro-entérologie  
Mr Saharé FONGORO Néphrologie  
Mr Bakoroba COULIBALY Psychiatrie  
Mr Kassoum SANOGO Cardiologie  
Mr Seydou DIAKITE Cardiologie  
Mr Mahamadou B. CISSE Pédiatrie  
Mr Arouna TOGORA Psychiatrie

### 5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO Neurologie

## D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

### 1. PROFESSEURS

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique

### 2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Arouna KEITA †	Matière Médicale
Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie, Chef de D.E.R.

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Drissa DIALLO	Matières Médicales
Mr Alou KEITA	Galénique
Mr Ababacar I. MAIGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique

## D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

### 1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA	Santé Publique, Chef de D.E.R.
---------------------	--------------------------------

### 2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA	Santé Publique
--------------------	----------------

### 3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE	Santé Publique
--------------------	----------------

### 4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique

## CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Bokary Y. SACKO	Biochimie
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Arouna COULIBALY	Mathématiques
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie Médicale
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie
Mr Boubacar TRAORE	Pharmacognosie
Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire
Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Biostatistique
Mr Mangara M. BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Lamine TRAORE	Ophtalmologie

## ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA	Bromatologie
Pr. Babacar FAYE	Pharmacodynamie
Pr. Eric PICHARD	Pathologie Infectieuse
Pr. Mounirou CISS	Hydrologie
Pr. Amadou Papa DIOP	Biochimie

# DEDICACES

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

### **A DIEU**

Le tout puissant, le miséricordieux, de m'avoir donné la santé et le courage de venir à bout de ce travail. Que sa bénédiction et sa protection soient sur tous. Amen !

**A son PROPHETE MOHAMED** paix et salut sur son âme.

**A mes grands parents paternels** (grand- mère in memoriam et grand- père in memoriam).

### **A mes grands parents maternels**

J'ai toujours trouvé auprès de vous attention et amour. Trouvez ici l'expression de mes meilleurs souvenirs et de ma reconnaissance à votre égard.

### **A mon père feu Mohamed SAMAKE in memoriam**

Très cher papa tu nous a montré à nous tes enfants, le chemin du travail bien fait et du courage. Ta rigueur dans l'éducation a toujours guidé nos pas. Ta sagesse, tes critiques et ta culture d'une famille unie resteront à jamais dans notre mémoire. Tu restes pour nous un modèle. Nous avons espéré partager ce moment solennel avec toi, mais Dieu en a décidé autrement en t'arrachant à notre affection. Puisse ce travail te faire plaisir jusque dans ta dernière demeure. Que le tout Puissant, le Miséricordieux t'accorde le paradis. Amen !

### **A ma mère Fatoumata DIARRA**

Très chère maman tu as toujours eu le souci de bien faire et tu a été à mes côtés dans toutes les épreuves. Tu nous as toujours apporté ton aide inconditionnelle. Ton dévouement et ta détermination à faire de nous des modèles dans la bonne éducation se reflètent dans ce travail. Ta compréhension, ton soutien efficace et ta bénédiction de tous les instants nous ont permis d'atteindre notre objectif. Puisse ce modeste travail te donner un début de satisfaction de tes vœux les plus sincères. Que Dieu nous prête une longue vie pour que tu puisses partager avec le fruit de ce travail.

**A mes frères et sœurs :** Amadou , Fatoumata, Lamine, Maïmouna, Abdel kader, Fadima, Aminata.

Restons unis et solidaires. Vous m'avez donné le goût de la vie familiale par votre assistance perpétuelle à ma vie. Voici le résultat de votre travail. Trouvez ici l'expression de ma plus grande sympathie.

**A mon homonyme TRAORE Mariam SAMAKE**

Tes conseils ne m'ont pas manqué tout le long de mes études. Ta sagesse et ton amour ont fait de vous une femme exemplaire. Que Dieu t' accorde une bonne santé et une longue vie.

**A mon oncle Chaka DIARRA**

Aucun mot ne pourra exprimer sincèrement mes sentiments, j'ai trouver auprès de toi la tendresse parentale sans pareille. Trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

**A mon fiancé Docteur TRAORE Diakaridia**

Pour ton soutien tout au long de mon cycle à la Faculté.

Que Dieu nous aide à fonder notre foyer dans la paix et dans la joie.

**A mes neveux et nièces**

Je vous souhaite une longue vie pleine de santé et de succès. Que la bénédiction de Dieu soit avec vous.

**A tous les enfants malades du monde**

Que Dieu leur donne la santé.

# REMERCIEMENTS

## REMERCIEMENTS

**A ALLAH** le tout puissant et son Prophète MOHAMED (paix et salut sur lui).

### **Aux familles**

SAMAKE à Kalaban coura, Quinzabougou, Badalabougou  
A toute la famille de feu Lamine DIARRA à Ségou.

### **A tous mes oncles et tantes**

Pour leurs encouragements.

### **A tous mes cousins et cousines.**

### **A mes beaux frères et belles sœurs.**

Pour leurs encouragements.

### **A nos partenaires Américains :**

Monsieur le Professeur et Directeur CVD Baltimore Myron M. Levine MD, DTPH et son équipe.  
Particulièrement Karen L. Kotloff, MD ; James D. Campbell, MD ; Milagritos D. Tapia, MD.  
Pour leur sympathie et leur sagesse.

### **Au Docteur Samba O. SOW, MD, MSc coordinateur CVD- Mali et tout le personnel du CVD.**

Particulièrement à ma sœur Wadia KARAMBE et à mon tonton Yaya SANGARE, pour avoir guidé mes premiers pas en bactériologie.

### **Au personnel de l'hôpital Gabriel TOURE, plus particulièrement tout le personnel du laboratoire d'analyses médicales.**

Je vous remercie d'avoir participé à ma formation.

### **A mon ami KARABENTA Ousmane et à tous mes amis(es).**

Pour leur soutien interminable.

**Au sergent chef Mariam Lamine DIARRA de la DSSA**

Pour ta contribution immense à la réalisation de ce travail. J'en suis profondément reconnaissante.

**A tout le personnel de la Direction du Service de Santé des Armées (DSSA)**

Pour la disponibilité et la sympathie dont il m'a montré.

**A Monsieur Mamadi SISSOKO Monsieur Mohamed DOUMBIA et Monsieur Sidi SOUMARE**

Pour leur contribution immense à la réalisation de ce travail et le service de l'outil informatique.

**A tous ceux qui m'ont encadrés dans les écoles.**

Mes chers enseignants merci pour toute la formation que vous m'avez donnée.

**A tous les Etudiants(es) de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie particulièrement à toute ma promotion.**

Pour le souvenir des années passées ensemble.

**A toutes les personnes de bonne volonté de près ou de loin, qui ont contribué à la bonne réussite de ce travail, qu'elles en soient remerciées.**

## **AUX MEMBRES DU JURY**

➤ A notre maître et président de jury :

**Professeur Amadou DIALLO.**

**Professeur de zoologie.**

**Chef de DER des Sciences Fondamentales à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie du Mali.**

Cher Maître c'est avec un grand plaisir que vous nous faites en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Votre simplicité et votre modestie font de vous un homme admirable. Dès nos premiers pas dans cette Faculté nous avons été impressionnés par votre sens élevé de la personnalité humaine. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail et vos qualités d'homme de science, de culture, de chercheur font de vous un exemple à suivre.

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

➤ A notre maître et juge

**Docteur KEITA Tatiana**

**Maître Assistant en Pédiatrie à la FMPOS.**

Vous nous faites honneur en acceptant de siéger dans ce jury malgré vos multiples occupations.

Votre souci de travail bien fait, vos valeurs morales et scientifiques constituent à nos yeux une source d'inspiration.

La courtoisie et l'esprit de collaboration qui vous animent nous ont beaucoup marqué.

Nous vous prions d'accepter nos sentiments de sincère reconnaissance et de profond respect.

➤ A notre maître et co- directeur

**Docteur Souleymane DIALLO**

**Maître Assistant en bactériologie et Virologie à la FMPOS.**

**Biologiste du Service de Santé des Armées (DSSA).**

**Chef de service du laboratoire de l'Hôpital Gabriel TOURE.**

**Lieutenant – Colonel des forces Armées du Mali.**

Votre rigueur scientifique, votre simplicité, votre ardent désir à transmettre aux autres vos larges connaissances et vos compétences techniques font de vous un homme de science apprécié.

Votre apport pour la réalisation de ce travail fut plus que considérable : il est aussi le vôtre.

Tout en espérant continuer à apprendre dans votre école, recevez cher Maître l'expression de notre profonde gratitude, de notre reconnaissance sincère et de notre attachement inconditionnel.

➤ A notre maître et Directeur de thèse

**Professeur Flabou BOUGOUDOGO**

**Maître de conférence agrégé en Bactériologie et Virologie à la**

**FMPOS. Directeur de l'Institut de Recherche en Santé Publique**

**Responsable des cours de bactériologie et virologie à la FMPOS.**

Vous avez accepté la réalisation de cette thèse dans notre service.

Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître admiré, permettez, cher maître, de vous réitérer toute notre reconnaissance et veuillez trouver ici notre profond respect et nos sincères remerciements.

## ABREVIATIONS ET SIGLES

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ASLO :	Antistreptolysine O
BD :	Becton Dickinson
BGN :	Bacille Gram Négatif
BGP :	Bacille Gram Positif
CGPgr :	Cocci Gram Positif en grappe
CGPch :	Cocci Gram Positif en chaîne
CGPpr :	Cocci Gram Positif en paire
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CO <sub>2</sub> :	Dioxyde de carbone
CoccoBGN :	Cocco Bacille Gram Négatif
CVD :	Centre pour le Développement des Vaccins
DCGN :	Diplocoque Gram Négatif
(G + C) % :	(Guanine + Cytosine)%
g/l :	gramme par litre
HCl :	Acide Chlorhydrique
HGT :	Hôpital Gabriel TOURE
HNP "G" :	Hôpital National du Point "G"
H <sub>2</sub> S :	Hydrogène sulfureux
INRSP :	Institut National de Recherche en Santé Publique
LBA :	Lavage Broncho- Alvéolaire
LCR :	Liquide Céphalo- Rachidien
LDC :	Lysine Décarboxylase
µg :	micro- gramme
ml :	millilitre
NaCl :	Chlorure de sodium
ODC :	Ornithine Décarboxylase
ONPG :	Ortho-Nitro-Phényl-β-d-galactopyranosidase
PCR :	Polymerase Chain Reaction
pH :	Potentiel d'Hydrogène
PLP :	Protéines de Liaison aux Pénicillines
QC :	Qualité de Contrôle
RAA :	Rhumatisme Articulaires Aiguë

RM : Rouge de Méthyle  
SCN : Staphylococcus à Coagulase Négative  
SIRS : Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique  
TDA : Tryptophane Désaminase  
UFC/ml : Unité Formant Colonie/ml  
VP : Voges Proskauer

<b>SOMMAIRE</b>	<b>PAGE</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJECTIFS</b>	<b>4</b>
<b>III. GENERALITES SUR L'HEMOCULTURE</b>	<b>5</b>
III. 1. Historique	5
III. 2. Conditions de prélèvement et intérêt de l'hémoculture	6
III. 3. Objectifs et paramètres de l'hémoculture	7
III. 4. Principaux germes des hémocultures	9
<b>IV. METHODOLOGIE</b>	<b>34</b>
IV. 1. Cadre d'étude	34
IV. 2. Appareillage	34
IV. 3. Protocole de technique des hémocultures positives	37
IV. 4. Techniques utilisées	41
IV. 4. 1. Coloration de Gram	41
IV. 4. 2. Tests biochimiques et métaboliques	44
IV. 4. 3. Tests immunologiques	55
IV. 5. Tests de sensibilité des antibiotiques	59
IV. 6. Conservation des cultures pures	64
IV. 7. Eléments de l'assurance qualité	65
<b>V. RESULTATS</b>	<b>67</b>
<b>VI. COMMENTAIRES et DISCUSSION</b>	<b>89</b>
<b>VII. CONCLUSION et RECOMMANDATIONS</b>	<b>93</b>
VII. 1. Conclusion	93
VII. 2. Recommandations	95
<b>VIII. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>96</b>
<b>IX. RESUME</b>	<b>98</b>
<b>X. ANNEXES</b>	<b>100</b>

# CHAPITRE I INTRODUCTION

## I. INTRODUCTION

Le sang est un liquide normalement stérile. La présence d'une bactérie quelle qu'elle soit est donc toujours anormale (sauf contamination du prélèvement). [12]

L'hémoculture se donne pour but de rechercher la présence de bactéries dans le sang, ce qui témoigne d'une bactériémie ou d'une septicémie. [22]

L'hémoculture est un examen très performant. Il est sensible (on détecte, en théorie, une seule bactérie viable dans l'échantillon examiné). [12].

Pour avoir quelques chances de succès, les hémocultures doivent être faites le plus tôt possible, à la phase de début de la maladie, avant la réponse anticorps et surtout avant tout traitement antibiotique. [22].

Mais il faut se souvenir que 15% environ des hémocultures positives sont des hémocultures qui ont été contaminées lors du prélèvement. [12]

Devant un tableau de septicémie veineuse, avec frissons et fièvre élevée, les prélèvements sont effectués à l'acmé de chaque poussée fébrile. [22].

En cas de septicémie endocarditique (maladie d'Osler), il est nécessaire de multiplier les hémocultures sans toutefois dépasser la dizaine en 48 heures, même en l'absence de fièvre importante. [22].

Au cours des septicémies, le nombre de bactéries dans le sang est souvent très faible. Il s'ensuit que la recherche de bactéries à l'examen direct est inutile, seule une culture est assez sensible pour révéler leur présence ; qu'une quantité assez importante de sang doit être mise en culture si on veut avoir une chance qu'elle contienne au moins une bactérie et que les délais de culture sont parfois longs.

Au cours des septicémies, la présence de bactéries dans le sang est intermittente. Il est donc nécessaire de réaliser plusieurs hémocultures. [12]

Trois prélèvements, suffisent généralement. En cas de septicémie d'origine lymphatique, où la fièvre est régulièrement croissante ou en plateau, le moment des hémocultures importe moins. [22].

Le sang contient des facteurs limitant la croissance bactérienne (phagocytes, complément, lysozyme, anticorps, parfois antibiotiques). Il est nécessaire de diminuer leur activité en diluant le prélèvement dans une grande quantité de milieu de culture. C'est aussi pourquoi il faut systématiquement subcultiver les hémocultures. [12].

Le prélèvement est effectué après une antiseptie soignée de la peau (alcool iodé), l'échantillon de sang est prélevé par ponction veineuse et ensemencé en conditions aérobie et anaérobie [12]. Eventuellement sous atmosphère riche en CO<sub>2</sub> lorsque certains germes comme *Haemophilus* sont suspectés. [22].

Il est recommandé de prélever au moins 5 ml de sang chez l'enfant. [22]

Les milieux de culture utilisés sont liquides, semi- gélés ou biphasiques. Ces milieux doivent permettre la croissance de la plupart des bactéries rencontrées en médecine (bouillon cœur-cerveau, trypticase soja, milieu au thioglycolate pour anaérobie, etc.). [12].

Divers flaconnages sous pression réduite facilitent et rendent plus sûre la pratique de l'hémoculture c'est le cas du flacon de bouillon de Bactec. [22].

Des automates (Bactec chez Becton Dickinson, Argos chez Sanofi-Pasteur, Vital chez bio Mérieux, Bact Alert chez Organon Technica...) permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance des bactéries (CO<sub>2</sub>, ion H<sup>+</sup>, variation du potentiel redox du milieu). Ces méthodes présentent des avantages certains comme les lectures multiples ou même en continu au cours des heures qui suivent le prélèvement, l'incubation sous agitation et la détection standardisée des hémocultures positives.

Globalement, ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats à la fois grâce à la vitesse de croissance des bactéries dans ces conditions, à la sensibilité de la détection et à la multiplicité des lectures. [12].

La pratique de l'hémoculture dans notre laboratoire est venue à la suite de «l'Etude prospective en milieu hospitalier des causes de maladies bactériennes invasives chez les enfants de 0 à 16 ans hospitalisés dans les Services de Pédiatrie de l'Hôpital Gabriel TOURE (HGT) à Bamako, Mali, période de février 2002 à février 2003».

Cette étude a été initiée par le Centre pour le Développement des Vaccins (CVD) Mali en collaboration avec le "Center for Vaccine Development" (CVD) - Baltimore (USA). Elle a pour but de mettre en place une technique standard de l'hémoculture pour assurer la qualité du diagnostic bactériologique des bactériémies et septicémies en milieu pédiatrique à l'HGT.

# **CHAPITRE II**

## **OBJECTIFS**

## **II. OBJECTIFS**

Nos objectifs sont les suivants :

### **1. OBJECTIF GENERAL**

Mettre en place une technique standard de l'hémoculture dans le laboratoire d'analyse de l'Hôpital Gabriel TOURE.

### **2. OBJECTIFS SPECIFIQUES :**

- 1- Pratiquer la Coloration de Gram à partir des hémocultures en Bactec.
- 2- Isoler et identifier par l'hémoculture les germes responsables des septicémies et bactériémies.
- 3- Réaliser l'antibiogramme des germes isolés.
- 4- Mettre en place un système d'assurance qualité (AQ) dans le laboratoire de bactériologie de l'HGT.
- 5- Procéder à la conservation des souches bactériennes.
- 6- Décrire les résultats d'une année de pratique de l'hémoculture.

# CHAPITRE III GENERALITES

### III. GENERALITES SUR L'HEMOCULTURE

#### III. 1. Historique :

Bien que l'hémoculture soit intégrée à la médecine aujourd'hui, il semble pourtant que la mise au point de cette nouvelle technique ne soit ni simple ni rapide.

##### Evolution des techniques d'hémocultures

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

En 1850, M. C. DAVAINÉ un médecin Parisien fait un examen microscopique du sang d'un mouton mort de charbon, alors appelé « sang de rate » et observe des bâtonnets plus ou moins longs et flexueux.

Mais la microbiologie n'étant pas encore née DAVAINÉ ne rend pas ces infusoires responsables de la maladie.

En 1860, DELAFOND à Alfort trouve l'idée de mettre « en culture le sang en dehors de l'organisme ».

En effet, il prélève du sang sur des animaux malades du charbon encore vivants et aussi sur des cadavres.

Ce sang est « déposé dans de petits vases en verre à ouverture élargie et placé à l'air libre. Quatre jours après, les baguettes avaient augmenté du double et du triple de leur longueur».

Le but qu'avait DELAFOND d'étudier les variations morphologiques des éléments microscopiques était atteint.

Bien qu'aucun milieu nutritif n'ait été utilisé à l'époque, la notion d'hémoculture était née.

Il faut cependant attendre les années 1863 pour que DAVAINÉ affirme avec PASTEUR que les éléments microscopiques qu'ils ont nommés « bactériidies » étaient responsables du charbon.

Ainsi dès 1865, le rôle que joue, la « culture de sang », apparaît dans les travaux de Louis PASTEUR (1822-1895).

Il s'agit d'une part, de ses recherches sur la bactériidie charbonneuse et d'autre part sur la « théorie des germes et ses applications à la médecine et à la chirurgie », parues en 1878. PASTEUR met alors en évidence :

La virulence du germe cultivé en dehors de l'organisme,  
La stérilité du milieu sanguin dans les conditions normales, et la possibilité de réaliser une culture pure in vitro des bactéries isolées d'un animal charbonneux.

Notons que L. COZE et V. FELTZ (Professeurs à la Faculté de Médecine de Strasbourg), avaient dès 1866 relaté des faits similaires.

Les recherches se poursuivent sur les milieux de culture les mieux appropriés ainsi que sur la méthode de prélèvement. [18].

### **III. 2. Conditions de prélèvement et intérêt de l'hémoculture :**

Le prélèvement est effectué si possible avant la mise en place d'un traitement antibiotique. Il s'agit d'un prélèvement de sang veineux réalisé en général au pli du coude ; le volume prélevé est immédiatement injecté dans des flacons pour hémoculture. En général, 3 prélèvements, espacés de 3 ou 4 heures, sont effectués, si possible au moment des pics de température ou au contraire d'hypothermie.

Le sang est normalement stérile. Il est essentiel de pouvoir mettre en évidence une bactériémie, le retard de prise en charge du patient et donc le retard de diagnostic jouant sur la fréquence de décès. L'hémoculture est donc un examen urgent et les résultats rendus doivent être aussi fiables que possible.

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

Le résultat normal est : Culture stérile

Les résultats pathologiques portent sur :

- L'isolement répété du même germe (septicémie dont le point de départ infectieux pourra être précisé par le germe identifié, le contexte clinique : infection pulmonaire, endocardite, pyélonéphrite, infection après intervention chirurgicale, morsures ou griffures animales, infection nosocomiale acquise à l'hôpital.).

- L'isolement de germes différents : il faudra alors évoquer un terrain [8]

### III. 3. Objectifs et paramètres de l'hémoculture : [10]

#### III. 3. 1. Objectifs :

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hémoculture est un examen essentiel qui va permettre l'identification de la ou des bactérie(s) présente(s) dans le sang, et réaliser un antibiogramme afin de permettre une adaptation thérapeutique.

Pour ce faire, il va falloir différencier la ou les bactérie(s) pathogène(s) des bactéries contaminants.

En effet, environ 30 à 50% des patients présentant une hémoculture positive sont des faux positifs, soit autant de contaminations que de vraies bactériémies, ce qui va donc perturber l'interprétation des résultats. [4] Afin de diminuer ce risque de faux positifs et d'identifier avec certitude la ou les bactéries incriminées, certains paramètres techniques sont à prendre en compte :

- Paramètres pré analytiques tout d'abord, c'est-à-dire réaliser un prélèvement de qualité
- Paramètres analytiques comprenant le choix d'un milieu de croissance optimal, une atmosphère adaptée, une dilution suffisante, une détection précoce.

Enfin, une confrontation avec la clinique semble indispensable afin d'incriminer ou d'éliminer le pathogène détecté.

### III. 3. 2. Paramètres pré analytiques :

Ils sont essentiels pour un rendu de résultats de qualité

- Réaliser un prélèvement de qualité

Le prélèvement, en lui-même, est une étape essentielle à tout examen bactériologique, afin de diminuer le nombre de contaminants. Le prélèvement de sang doit donc satisfaire à plusieurs critères ou exigences, il est effectué par ponction veineuse périphérique après désinfection.

En fonction du contexte clinique, on peut utiliser des systèmes particuliers : système isolator (centrifugation pour germes à croissance difficile), système Sabouraud, système avec une résine adsorbante de cations ou du charbon activé (neutralisation, non consensuelle, de l'action des antibiotiques).

- Transport

Le transport doit être immédiat, si ce dernier n'est pas possible, on peut conserver l'hémoculture à l'étuve (la conservation à la température ambiante est possible pour une durée limitée).

- Volume total de sang prélevé mis en culture

C'est la variable la plus importante pour une réalisation convenable de l'hémoculture, en effet la densité des bactéries présente dans le sang est faible chez l'adulte, avec une médiane de 1 UFC/ml, et 25% des patients présentant une densité < 0.1 UFC/ml.

Il existe une relation directe entre le volume de sang inoculé dans les flacons et le rendement de la technique :

10ml à 20ml : +30% de positivité (+1.5%/ml)

20ml à 40ml : +19% de positivité (+1%/ml)

40ml à 60ml : +10% de positivité (+0.5%/ml).

Une augmentation de volume va donc entraîner une augmentation de la sensibilité de la détection de la positivité. Un volume total de sang de 20 à 30ml est donc conseillé. Par contre chez l'enfant, la densité bactérienne dans le sang est plus élevée, souvent > 1000 UFC /ml, le volume total de sang conseillé chez l'enfant se trouve donc diminué de 1 à 2 ml.

Le Contrôle, par le laboratoire, du volume de sangensemencé est difficile (notamment pour les prélèvements pédiatriques).

### III. 4. Principaux germes des Hémocultures

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

Si les bactériémies vraies sont le plus souvent mono microbiennes, une hémoculture positive poly microbienne (associée à certaines espèces) oriente plutôt vers une contamination du prélèvement. *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*, bactéries de la flore cutanéomuqueuse, sont des contaminants dans plus de 95% des cas. Les staphylocoques coagulase négative (85% de contaminants), les entérocoques (20% de contaminants), et les streptocoques du groupe *viridans* (60% de contaminants) peuvent cependant, dans un certain nombre de cas, être responsables de bactériémies vraies : La distinction vrai/ faux positif pourra se faire en répétant les hémocultures chez le malade et surtout en tenant compte de la clinique.

#### III. 1. Cocci Gram positif :

##### III. 1. 1. *Streptococcus* :

Les Streptocoques appartenant au genre *Streptococcus* sont des coques à Gram positif ; les cellules sont ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, formant des chaînettes ou des paires. Ils sont dépourvus de cytochromes et de catalase. La fermentation des glucides est homo fermentative, l'acide lactique dextrogyre étant le principal produit final, sans formation de gaz. Ils sont exigeants en vitamines, acides aminés, purines et pyrimidines.

Ils poussent sur milieux usuels enrichis de sang, sérum et/ou ascite. Le contenu en ( G + C ) % de l'ADN est compris entre 33 et 42.

Les infections streptococciques, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes et les plus sévères des infections bactériennes, en dépit des moyens thérapeutiques efficaces disponibles actuellement.

La plupart des Streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. La colonisation des muqueuses et des téguments par les Streptocoques est due à leur capacité d'adhésion spécifique aux cellules épithéliales de l'hôte. Par leur présence dans la flore normale, ils jouent un rôle important dans l'équilibre écobactériologique et dans l'acquisition de l'immunité naturelle non spécifique. Cette flore commensale (Streptocoques oraux, Streptocoques des groupes B, C, D, G, L et *Streptococcus pneumoniae*) peut devenir pathogène dans certaines circonstances particulières et être responsable d'un grand nombre d'infections streptococciques sévères. Les Streptocoques du groupe A, bien qu'ils puissent se trouver à l'état latent sur la muqueuse pharyngée de nombreux porteurs sains, sont des bactéries très pathogènes chez l'homme. [16].

### III. 1. 1. 1. *Streptococcus pneumoniae* :

Reconnus par Pasteur dès 1881 dans la salive d'un patient atteint de rage puis dans la salive normale, les pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*) sont des cocci à Gram positifs appartenant à la flore commensale des voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux. [11].

En raison de son important pouvoir pathogène pour l'homme, *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, les transferts génétiques (découverte de la transformation bactérienne dont l'étude a permis de montrer que l'ADN est le support de l'information génétique). [6].

*Streptococcus pneumoniae* ou pneumocoque est un hôte naturel des muqueuses de l'Homme et des mammifères. Chez l'homme il est avant tout l'agent de la pneumonie franche lobaire aiguë. Il est aussi rencontré dans les méningites, les septicémies, les pleurésies et les rhinopharyngites.

**Caractères bactériologiques :**

Les pneumocoques sont des cocci Gram positif qui apparaissent dans les produits pathologiques comme des diplocoques lancéolés et capsulés en forme de 8 très caractéristiques, parfois associés en courtes chaînettes. [11].

**Caractères morphologiques :**

Le pneumocoque est un coccus à Gram positif, se groupant en diplocoques ou en courtes chaînettes. Les souches virulentes sont capsulées. [ 2]

**Caractères culturaux :**

La culture est facile sur gélose au sang. Le germe pousse en 24 à 36 heures en donnant des colonies petites de 0,5 à 1,5 mm de type S transparentes, brillantes, non pigmentées en goutte de rosé ; cette pousse est favorisée par le CO<sub>2</sub>. sur gélose au sang, les colonies sont entourées d'une zone d'hémolyse verdâtre incomplète ( $\alpha$  hémolyse). [11]

**Caractères biochimiques :**

Le pneumocoque comme les streptocoques est dépourvu de catalase et pousse en aéro-anaérobiose.

La bile et les sels biliaires lysent les cultures jeunes de 6 à 8h du germe (Neufeld), à l'inverse des autres Streptocoques. Sa croissance est inhibée par l'éthylhydro-cupréine (test à l'optochine ) [ 2]

**Caractères antigéniques :**

Bien que la structure de la paroi des pneumocoques soit similaire à celle des autres streptocoques, ils s'en différencient par la présence d'une capsule polysaccharidique qui par son pouvoir antiphagocytaire leur confère une forte virulence pour les animaux. Cela permet de distinguer plus de quatre vingt sérotypes. Le sérotypage peut être réalisé dans un but épidémiologique en observant au microscope un "gonflement" de la capsule en présence d'anticorps opsonisants. La structure de cette capsule varie d'un sérotype à l'autre. [11].

La constitution antigénique des polysaccharides de la capsule permet d'individualiser plus de 80 types sérologiques de pneumocoques, dénommés 1, 2, 3, etc. la sérotypie des souches présente un intérêt épidémiologique.

**Pouvoir pathogène :**

Le pneumocoque est un germe commensal des voies aériennes supérieures. Les infections par ce germe sont d'abord localisées aux voies respiratoires telles que la sphère oto-rhino-laryngologiques (O. R. L.) ou le poumon.

A partir du foyer infectieux d'origine, les germes ont la capacité de se propager par contiguïté ou par voie hématogène.

Lors des pneumonies à pneumocoques l'infection localisée au tissu alvéolaire près de là peut gagner la cavité pleurale déclenchant une pleurésie à pneumocoque.

L'infection des voies aériennes supérieures peut parfois essaimer par voie hématogène. Ainsi dans près de 25 p 100 des cas de pneumonies à pneumocoques, les bactéries se propagent aux ganglions du hile et gagnent le sang. Les bactéries peuvent alors constituer des foyers métastatiques : méningite purulente, arthrites (surtout chez le vieillard), endocardite ou péritonite. La dissémination hématogène est particulièrement fréquente chez les malades atteints de maladies sous-jacentes ou de déficits immunitaires congénitaux ou acquis. [11]

Les infections à pneumocoques représentent un problème important de santé publique en raison de leur fréquence et leur gravité : leur taux de mortalité varie de 10 à 20 % en fonction du type d'infection et du terrain.

Les infections neuroméningées représentent la deuxième cause des méningites bactériennes après *Haemophilus influenzae*. Les septicémies vont volontiers se compliquer de manifestations multiples, au niveau des séreuses : articulaires, péritonéales, péricardiques, méningées.

Le diagnostic d'infection à pneumocoque est fait par la mise en culture des produits pathologiques. [14]

**Sensibilité aux antibiotiques :**

L'apparition, il y a quelques années, de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline, phénomène qui touche actuellement 25 à 30% des souches, a complètement modifié le comportement thérapeutique vis à vis du pneumocoque qui était auparavant très sensible à la

pénicilline. Cette diminution de la sensibilité à la pénicilline G est due à des modifications des PLP, qui vont entraîner une sensibilité également modifiée pour l'ensemble des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, avec des sensibilités variables pour chaque molécule. La résistance aux autres antibiotiques augmente également : tétracyclines (25%), cotrimoxazole (37%) avec de plus en plus de souches multirésistantes.

Les pneumocoques restent sensibles aux synergistines, rifampicines, glycopeptides et certaines fluoroquinolones. Comme tous les streptocoques, les pneumocoques sont résistants aux aminosides. [14]

### **Diagnostic bactériologique :**

Les diagnostics bactériologiques d'une infection à pneumocoques reposent sur deux méthodes :

La méthode classique : l'isolement de la bactérie à partir d'un produit pathologique (coloration de Gram, culture, antibiogramme).

Une méthode complémentaire, la détection des antigènes capsulaires du pneumocoque dans les produits pathologiques (contre-immuno-électrophorèse et l'agglutination de particule de latex). [11]

### **Eléments thérapeutiques :**

L'apparition, il y a quelques années, de souches de sensibilité diminuée à la pénicilline, phénomène qui touche actuellement 24 à 30 % des souches, a complètement modifié le comportement thérapeutique vis à vis du pneumocoque qui était auparavant très sensible à la pénicilline. Cette diminution de la sensibilité à la pénicilline G est due à des modifications des PLP (Protéine de Liaison aux Pénicillines) (phospholipides), qui vont entraîner une sensibilité également modifiée pour l'ensemble des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, avec des sensibilités variables pour chaque molécule. La résistance aux autres antibiotiques augmente également : tétracyclines (25 %), cotrimoxazole (30 %) avec de plus en plus de souches multirésistantes.

Les pneumocoques restent sensibles aux synergistines, rifampicines, glycopeptides et certaines fluoroquinolones. Comme tous les streptocoques, les pneumocoques sont résistants aux aminosides.

Un antibiogramme est donc devenu indispensable devant tout échec thérapeutique lors d'une infection à pneumocoque, avec étude des Concentrations Minima Inhibitrices (CMI) aux différentes  $\beta$ -lactamines en cas de sensibilité diminuée à la pénicilline (en particulier céfotaxime et céftriaxone). [14].

### III. 1. 1. 2. Streptocoques $\beta$ -hémolytiques :

#### III. 1. 1. 2. 1. Streptococcus pyogenes (ou Streptocoques du groupe A) :

Coccus à Gram positif associés en chaînettes, *Streptococcus pyogenes* dénommé aussi " streptocoque du groupe A ", " streptocoque  $\beta$ -hémolytique du groupe A ". Il est responsable d'angines, de suppurations, d'infections localisées ou invasives (cellulites gangreneuses, ou fascites nécrosantes et septicémies) qui peuvent être accompagnées d'un choc toxique. Des complications inflammatoires sévères, comme la cardite rhumatismale, peuvent se manifester quelques semaines après une infection bénigne, voire inapparente. Le streptocoque du groupe A est très sensible à la pénicilline G.

#### Écologie :

Bactéries strictement humaines, les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques du groupe A se propagent par petites épidémies dans l'entourage des enfants atteints de pharyngite ou de scarlatine ou entraînent, par l'intermédiaire des porteurs sains, des cas sporadiques d'infections pharyngées ou cutanées.

#### Caractères bactériologiques et immunologiques :

Cocci à Gram positif arrondis, entourés d'une capsule (invisible à l'examen direct en microscopie optique), disposés en chaînettes, *Streptococcus pyogenes* se multiplie sur gélose au sang en donnant en 24 heures des colonies de petite taille entourée d'un halo d'hémolyse complète à bords nets ( $\beta$ -hémolyse). Les Streptocoques pyogènes peuvent être identifiés rapidement par des méthodes antigéniques ou le Pyr-test, un test de sensibilité à la bacitracine peut utilement aider dans la différenciation de streptocoque pyogène des petites colonies étrangères du groupe A ou d'autres espèces Pyr- positif bêta – hémolytique. Un disque de bacitracine de 0,04 unités est appliqué sur une gélose de sang de cheval ou de mouton et incubé à 35°C pendant une nuit, toute zone d'inhibition est considérée comme une sensibilité. [20].

Cette espèce possède l'antigène A de la classification de LANCEFIELD

**Substances biologiquement actives :**

Structures externes : La capsule et la protéine M présentes à la surface des bactéries empêchent la phagocytose et sont des facteurs majeurs de virulence. La protéine M et les acides téichoïques jouent un rôle dans l'adhérence des streptocoques du groupe A aux cellules épithéliales, de même que la protéine F, récepteur de la fibronectine.

**Toxines** : Les toxines érythrogènes A et C provoquent la fièvre et l'éruption cutanée de la scarlatine ; la toxine B est moins active. Elles ont une activité de superantigène et stimulent des lymphocytes T polyclonaux qui libèrent des cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation, associés à l'état de choc et aux syndromes malins (scarlatine fulminante, infections mortelles des tissus mous). Ces toxines agissent aussi sur les monocytes, polynucléaires neutrophiles, et autres macrophages ; elles sont mitogènes et immunodépressives.

Les streptolysines sont les hémolysines dont l'effet est observé sur gélose au sang. La streptolysine O est active en anaérobiose et entraîne in vitro comme in vivo des lésions membranaires létales. Elle inhibe le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et diminue l'activité des cellules immunocompétentes. Elle est cardiotoxique. Elle suscite la formation d'anticorps antistreptolysines (appelés antistreptolysine O ou ASLO) et de complexes immuns, lorsqu'elle n'est pas inactivée par les lipides cutanés. La streptolysine S a également une action cytolytique leucotoxique.

Enzymes : La hyaluronidase favorise la diffusion de la bactérie dans les tissus. La C<sub>5a</sub>-peptidase est un facteur de virulence qui agit sur le complément. La streptokinase a des propriétés fibrinolytiques. Elle est immunogène, de même que la nicotinamide désaminase (NADase) et surtout la streptodormase B (ou " DNase " B) à l'origine de la production d'anticorps recherchés pour le diagnostic indirect des streptococcus.

**Diagnostic :**Diagnostic direct :

Le diagnostic d'une infection aiguë streptococcique est confirmé par la mise en évidence des streptocoques du groupe A, à partir des prélèvements faits au niveau des lésions (écouvillonnage pharyngé ou cutané, ponction de tissu sous-cutané ou d'épanchement) ou par les hémocultures. Un milieu de transport est utile si l'acheminement des prélèvements doit dépasser deux heures. La recherche de streptocoques pathogènes par examen microscopique direct est impossible du fait de la présence de streptocoques commensaux.

Les cultures sur milieu solide ( gélose au sang ) sont sensibles à la bacitracine.

Diagnostic indirect :

Les antistreptodormases peuvent être recherchées isolément ou de façon groupée avec les ASLO et les antistreptokinases. [14]

**Eléments thérapeutiques :**

Cette espèce est très sensible à la pénicilline G et aux macrolides. La prévention du RAA repose sur le traitement précoce des angines streptococciques. [14]

**III. 1. 1. 2. 2. Streptococcus agalactiae (ou Streptocoque du groupe B) :**

C'est un Streptocoque responsable d'infections néonatales. Il est présent au niveau rectal et vaginal chez la femme enceinte avec une forte fréquence. Il sensible aux pénicillines.

**Ecologie et pouvoir pathogène :**

*Streptococcus agalactiae* ou streptocoque du groupe B de LANCEFIELD est responsable de mammites et d'avortements chez les bovidés, mais est aussi pathogène pour l'Homme et responsable de septicémies néonatales avec détresse respiratoire (infections précoces) et/ou méningites (infections tardives), d'infections urinaires, génitales (endométrite) et cutanées parfois compliquées de septicémies. Les pneumonies, endocardites, ostéoarthrites et cellulites sont rares. Le portage vaginal et intestinal est fréquent, notamment chez la femme enceinte. Il peut aussi exister un portage cutané ou pharyngé.

**Caractères biologiques et substances biologiquement actives**

*Streptococcus agalactiae* forme des chaînettes de cocci à Gram positif. Cette espèce se multiplie sur milieux non enrichis et donne des colonies  $\beta$ -hémolytiques sur gélose au sang. L'antigène de paroi polysaccharidique C est spécifique du groupe B.

La capsule intervient dans l'invasivité des souches. Les acides lipotéichoïques interviennent dans l'adhérence aux cellules épithéliales. Les protéines de surface paraissent associées à la virulence.

**Diagnostic biologique :**

La recherche de *Streptococcus agalactiae* est une urgence en cas de suspicion d'infection néonatale. Elle repose sur l'examen microscopique direct des prélèvements et la mise en culture des prélèvements (LCR, hémoculture, liquides amniotique et gastrique).

**Épidémiologie et éléments de thérapeutique :**

Les souches de type sérologique III représentent la majorité des souches d'infections néonatales et la recherche de vaccins porte sur ce type sérologique. Dans certaines indications, une colonisation vaginale est recherchée à partir du troisième trimestre de grossesse par culture des sécrétions vaginales ou au moment de l'accouchement, par une technique de détection rapide. Selon le risque évalué de contamination de l'enfant, une antibiothérapie est prescrite pendant le travail. À la naissance, un nouveau-né à risque, mais non encore infecté, est traité préventivement selon les sites d'isolement des streptocoques (placenta, liquide amniotique) et l'importance d'une colonisation.

Les souches de *Streptococcus agalactiae* sont sensibles à la pénicilline G et à l'amoxicilline et souvent résistantes aux macrolides et aux tétracyclines. L'association pénicilline-aminoside est synergique. [14].

**III. 1. 1. 2. 3. Les autres *Streptococcus* :**

On peut citer les Streptocoques du groupe C (*Streptococcus equisimilis* et *Streptococcus equi*) et les Streptocoques du groupe G :

Ils sont proches des *Streptococcus pyogenes*. Ils sont responsables chez l'Homme d'infections pharyngées, parfois épidémiques et liées à des contaminations alimentaires.

Ils sont aussi à l'origine d'infections cutanées, de septicémies du post-partum, d'infections ostéo-articulaires, de méningites et de pneumopathies. Les infections à Streptocoques du groupe C ou du groupe G de LANCEFIELD sont rarement suivies de glomérulonéphrite aiguë, jamais de RAA.

Les Streptocoques du groupe F : *Streptococcus Anginosus* et *Streptococcus Constellatus* sont commensaux des muqueuses, en particulier intestinal, sont responsables chez l'Homme d'angines, de pleuropneumopathies et d'autres suppurations profondes, notamment péritonéales. [14]

### III. 1. 2. *Staphylococcus*

#### III. 1. 2. 1. *Staphylococcus aureus* :

Il s'agit de Cocci à Gram positif très fréquents chez l'Homme à l'état commensal ou comme pathogène.

Il est agent de suppurations, de septicémies, de toxi-infections et de chocs toxiques. Il est aussi agent d'infections nosocomiales. On observe de plus en plus une multirésistance des souches hospitalières, en particulier aux  $\beta$ -lactamines.

#### Habitat :

Le réservoir naturel de *Staphylococcus aureus* est l'Homme. Très rapidement après la naissance, *Staphylococcus aureus* colonise la peau, le tube digestif et la région périnéale des nouveau-nés.

Un pourcentage élevé de la population reste porteuse en permanence ou par intermittence en particulier dans les fosses nasales. À partir des sites de portage et de façon intermittente, il colonise les zones humides (aisselles) ou peut être isolé des mains. *Staphylococcus aureus* peut également être isolé de la peau et des muqueuses des animaux. Éliminée dans le milieu extérieur, cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement.

**Caractères morphologiques :**

*Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes (3 à 5 éléments), mesurant de 0,8 à 1 micromètre, gardant le Gram. Sur les cultures en milieu solide il se dispose en « grappe de raisin », alors qu'en milieu liquide il est souvent isolé en diplocoque.

Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches ; d'autres souches, formant des colonies mucoides, sont entourées d'une pseudo capsule. [16].

**Caractères bactériologiques :**

*Staphylococcus aureus* se présente sous l'aspect de cocci associés par deux (diplocoques) ou en amas. La grande majorité des souches est capsulée in vivo mais perdent progressivement leur capsule en culture. *Staphylococcus aureus* se développe rapidement sur les milieux usuels, s'accommode de grandes variations de pH (4,8 - 9,4) et de température de croissance (10 - 45°C). La plupart des souches élaborent un pigment donnant une couleur jaune-orangée aux colonies. *Staphylococcus aureus* est capable de croître en milieu hyper salé (permettant l'utilisation de milieux sélectifs). Il est identifié au laboratoire d'après ses caractères métaboliques et physiologiques. [14].

**Caractères biochimiques :**

Il donne des colonies ayant en général un pigment doré et attaque le mannitol sur milieu de chapman. Ce milieu contient aussi une forte concentration de NaCl qui inhibe la plupart des autres germes. Mais ce qui caractérise le mieux l'espèce aureus c'est la production d'une staphylocoagulase enzyme facile à mettre en évidence au laboratoire.

D'autres substances enzymatiques ou toxiques qui sont des facteurs de virulence, sont produites par *Staphylococcus aureus* : DNase, phosphatase, fibrinolysine, hyaluronidase, hémolysines, exfoliatine et leucocidine. La production d'une entérotoxine par certaines souches rend compte de leur pouvoir pathogène.

Il produit de l' $\alpha$  toxine sur gélose sang de mouton, c'est un endonucléase thermostable. [13]

**Classification :**

*Staphylococcus aureus* a 4 biotypes A, B, C, D se différenciant par la présence ou l'absence d'une fibrinolysine, d'une coagulase du plasma bovin, d'une hémolysine de type  $\alpha$  ou  $\beta$ .

Le biotype A aurait pour hôte dominant l'homme, le biotype B les volailles et les porcins, le biotype C les bovins et les ovins, le biotype D le lièvre. [13]

**Caractères cultureux :**

*Staphylococcus aureus* est aérobie, anaérobie facultatif et pousse facilement sur milieu ordinaire ; certains facteurs de croissance sont indispensables (vitamine B<sub>1</sub>, acide nicotinique); il n'exige pas de biotine ni de tryptophane. Il pousse en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et 14 aminoacides dont la cystéine, la thiamine et l'acide nicotinique. [16]

**Caractères biochimiques :**

*Staphylococcus aureus* possède un équipement enzymatique très complet qui le rend capable d'agir sur de nombreux hydrates de carbone, lipides, protéines. Les caractères biochimiques qui permettent le diagnostic rapide de genre sont : la présence d'une catalase, l'utilisation du glucose en anaérobiose. Le diagnostic d'espèce fait intervenir la fermentation du mannitol et la recherche de certaines enzymes : essentiellement coagulase [2]

**Éléments de thérapeutique :**

La pénicilline G et les aminopénicillines sont habituellement inactives. Les pénicillines M et céphalosporines, non hydrolysés par la pénicillinase, restent actives, sauf en milieu hospitalier où plus de 20% environ des souches sont résistantes à ces antibiotiques (les souches sont dites "mécilline résistantes" ou "méti-R"). [14]

**Diagnostic biologique :**

L'isolement et la caractérisation de la souche responsable constituent la base du diagnostic biologique des *Staphylococcus*.

La mise en culture est effectuée sur milieux ordinaires, sur milieu enrichis au sang et, pour les produits pathologiques plurimicrobiens, sur milieu sélectif (milieu de Chapman ou autre milieu). Certaines souches (mutants) ne poussent qu'en présence de CO<sub>2</sub>, de vitamine du groupe K ou d'acides aminés particuliers (tryptophane).

L'identification est fondée sur la morphologie en microscopie optique après coloration de Gram, sur l'aspect des colonies et sur la présence de catalase. L'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* reste fondée sur la mise en évidence de la coagulase libre du plasma de lapin, par la méthode en tube. [16].

### III. 1. 2. 2. Autres *Staphylococcus* :

Les Staphylocoques autres que *Staphylococcus aureus* sont souvent identifiés aux espèces non productrices de coagulase et sont connus comme "staphylocoques à coagulase négative" (SCN). Leur identification se faisant par opposition à *Staphylococcus aureus*, le terme de "*Staphylococcus non aureus* " (SNA) serait cependant préférable. Ce sont les principaux commensaux de la peau mais ils sont également isolés des muqueuses. La densité de colonisation est plus importante au niveau des régions situées à proximité des orifices ou les zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux. [14]

### III. 2. Bacilles GRAM négatifs

#### III. 2. 1. *Enterobacteriaceae*

##### III. 2. 1. 1. *Salmonella* :

Bacilles à Gram négatif, *Salmonella Typhi* est strictement humain. C'est le bacille d'EBERTH ( bactériologue allemand 1835-1926).

C'est aux savants français BRETONNEAU et LOUIS que revient la gloire d'avoir décrit les premiers la fièvre typhoïde (1822-1829). En 1880, EBERTH étudie le germe, pendant la même période, deux autres auteurs, le médecin russe SOKOLOV et le médecin allemand GAFFKY, ont pu isoler ce bacille en culture pure. Ensuite, en 1980, SCHOTTMULLER est parvenu à isoler deux bacilles voisins mais différents du bacille d'Eberth, que BRION et KAYSER appellent bacilles paratyphiques A et B. [7]

#### Caractères bactériologiques :

Les salmonella sont des Entérobactéries mobiles, à l'exception de celles appartenant à un sérovar aviaire, *Gallinarum-Pullorum*, de rares mutants " paralysés " dont les flagelles sont immobiles, et des mutants sans flagelles de sérovares normalement mobiles.

**Caractères culturaux :**

Après 18-24h d'incubation, les colonies ont un diamètre de 3 à 4 mm. Mais certaines cultures donnent des colonies naines, aspect constant chez certains sérovars (*Abortusovis*, *Typhisuis*), exceptionnel (mutants) chez ceux, la grande majorité, qui poussent habituellement sous forme de colonies normales. Le mur muqueux ne se voit qu'après plusieurs jours. Exceptionnellement on peut isoler des souches de salmonella poussant sous forme de colonies muqueuses, dont les dimensions et l'aspect rappellent ceux des *Klebsiella*. L'aptitude à pousser sous forme de colonies muqueuses est souvent perdue après quelques mois de conservation. Il est rare d'isoler de l'organisme des cultures sous forme R (Rought), à l'exception de celles provenant d'urine, où les salmonella sont fréquemment R pour des raisons non élucidées.

La majorité des souches de salmonella produisent des gaz de la fermentation du glucose et sont prototrophes. Les souches auxotrophes appartiennent essentiellement aux sérovars dont le pouvoir pathogène est restreint à un hôte particulier, par exemple *Typhi*, *paratyphi A*, *Sendai* que l'on n'isole que chez l'homme, *Abortusovis* que l'on ne trouve que chez les ovins, *Gallinarum-Pullorum* chez les volailles. Elles ne peuvent donc pousser sur le milieu synthétique au citrate de Simmons qui ne contient pas de facteurs de croissance.

**Caractères biochimiques :**

Le profil de la majorité des souches de salmonella isolées de l'homme et des animaux à sang chaud, appartenant à la sous-espèce *Salmonella enterica*, est le suivant : uréase -, TDA -, indole -, glucose + gaz, H<sub>2</sub>S +, lactose -, adonitol -, LDC +, ODC +, citrate Simmons +, gélatinase -, RM +, VP -. [16].

**Caractères antigéniques :**

Les antigènes sont de 2 types : Les antigènes somatiques : O, Vi, M et l'antigène flagellaire : H

- Antigène O est thermostable et alcool stable.

L'Agglutination O est lente, granulaire non dissociable par agitation.

L'endotoxine est une Grosse molécule de lipopolysaccharide dont le pouvoir toxique est du au lipide A et sa spécificité antigénique à la fraction polysaccharidique.

- Antigène Vi est un antigène d'enveloppe (K) n'existant que chez *Salmonella Typhi*, *Salmonella paratyphi C* et exceptionnellement chez *Salmonella Dublin*. Il donne une agglutination non détruite ni par l'alcool ni par le formol, mais thermolabile. L'antigène Vi est le récepteur de bactériophages spécifiques sur l'action desquels est basée la lysotypie. Comme l'agglutination O, l'agglutination Vi se produit lentement. Elle est fine et granuleuse.

- Antigène M chez les souches muqueuses ( exceptionnelles ). Résiste au formol et au chauffage à 60°C. Détruit à 100°C, par l'alcool ou HCl. Donne des sérums peu agglutinants : 1/20 au 1/100, Antigène M est Commun à tous les types de *salmonella* présentant des formes muqueuses.

- Antigène H est thermolabile, dénaturé par l'alcool. Agglutination H, rapide, floconneuse, dissociable par agitation. Constitué d'une protéine, la flagelline. [15]

### Pathogénie :

Le lipopolysaccharide de la paroi est une endotoxine thermostable.

Les salmonella font partie des bactéries entéropathogènes invasives. Après une destruction de la bordure en brosse des cellules intestinales, les bactéries pénètrent dans les cellules par une invagination de la membrane, atteignant en gagnant de proche en proche la lamina propria. La multiplication dans les foyers de pénétration cause des lésions ulcératives. Le mécanisme de la perte de liquide n'est pas éclairci. On peut supposer qu'elle résulte de la stimulation de l'adénylcyclase par les prostaglandines synthétisées à la suite de la réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse. L'argument en faveur de cette hypothèse est le fait que l'indométacine, qui inhibe la synthèse des prostaglandines, inhibe aussi la sécrétion liquidienne intestinale lors de l'infection expérimentale de la souris par *Salmonella Typhimurium*.

Reilly a déduit de ses travaux la conception suivante de la pathogénie de la fièvre typhoïde : après avoir passé la barrière intestinale, les bactéries arrivent au niveau des ganglions mésentériques. Ils s'y multiplient abondamment.

Une partie de la population bactérienne passe par voie lymphatique dans le courant sanguin, ce qui explique la septicémie. Une autre partie de la population se lyse, libérant du lipopolysaccharide toxique. Charrié par voie sanguine, celui-ci ira irriter le sympathique abdominal, provoquant par son intermédiaire l'ulcération des plaques de Peyer. Transporté au niveau des ventricules cérébraux, le lipopolysaccharide toxique provoquera l'abattement, le typhos qui a donné son nom à la fièvre typhoïde. [16].

#### **Sensibilité aux antibiotiques :**

Les Salmonelles sont susceptibles de développer une résistance acquise par deux mécanismes : le transfert de gène de résistance, d'origine plasmidique ou lié à des transposons, qui est le plus fréquent, et les mutations. Ces mécanismes sont favorisés par la pression antibiotique exercée au niveau du tube digestif.

Compte tenu des arguments bactériologiques et pharmacocinétiques, les fluoroquinolones représentent actuellement l'antibiotique de choix, suivies par les céphalosporines de troisième génération. L'antibiogramme est toujours nécessaire, en raison du risque d'émergence des résistances. [14].

#### **Isolement et identification :**

L'isolement des salmonella est fait essentiellement sur deux types de prélèvements : à partir du sang et des selles. [16].

#### **Diagnostic :**

L'isolement et le diagnostic de l'agent pathogène (qui permettent de conclure avec certitude, de disposer de la culture pour en étudier les marqueurs épidémiologiques et la sensibilité aux antibiotiques), et la mise en évidence d'anticorps dans le sérum. Cette méthode indirecte ne peut donner de résultat interprétable que lorsque les anticorps sont apparus, et ne peut permettre à elle seule d'affirmer le diagnostic de salmonellose, mais seulement de le rendre probable si les titres O et H sont suffisamment élevés et si on a constaté leur ascension au cours des prélèvements successifs. [16].

### **III. 2. 1. 2. *Escherichia coli***

Découvert par Escherich en 1885 et initialement connu sous le nom de « coli communs », [21] *Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif de l'intestin et de

l'environnement humain ou animal (tube digestif). Il est responsable d'infections spontanées des voies urinaires et de gastro-entérites et aussi responsable d'infections nosocomiales. C'est la bactérie pathogène la plus fréquemment retrouvée. Il a une tendance vers l'acquisition de résistance aux antibiotiques et est l'espèce type du groupe des *Enterobacteriaceae* ou entérobactéries.

Les *Escherichia coli* ou colibacilles sont des hôtes normaux de l'intestin : Ils représentent près de 80% de la flore intestinale aérobie de l'adulte (flore sous-dominante, car la flore dominante est à 99% anaérobie). [14].

#### **Caractères bactériologiques :**

Les *Escherichia coli* sont des bacilles à Gram négatif, soit mobiles, soit immobiles, parfois capsulés. L'étude biochimique permet le diagnostic d'espèce, voire du biotype.

#### **Les caractères biochimiques :**

Les plus connus sont :

Gaz en glucose +, en général ;

Lactose, mannitol, sorbitol + en général ;

Bêta galactosidase +, très rares exceptions ;

Indole + ;

Phénylalanine-désaminase, uréase, gélatinase, KCN, malonate, inositol, H<sub>2</sub>S, citrate de Simmons - ; [16].

#### **Les caractères antigéniques :**

Les antigènes de surface, O, H et K, éléments de la structure des *Escherichia coli*, sont à la base de la séparation en types sérologiques qui présentent un intérêt épidémiologique. À ces structures superficielles doivent être rattachés des antigènes protéiques qui se présentent fréquemment sous forme de fimbriae et confèrent aux bactéries des propriétés d'adhésion, première étape du pouvoir pathogène. Des protéines de la membrane externe peuvent augmenter la résistance à la bactéricide due au sérum ; ce sont des systèmes d'appoint dans le déterminisme du pouvoir pathogène. [14].

**Substances biologiquement actives :**

Les colibacilles peuvent produire diverses substances biologiquement actives comme des entérotoxines, des hémolysines, des enzymes capables de détruire certains antibiotiques et des bactériocines (dénommées colicines), substances à action antibiotique qui détruisent spécifiquement d'autres bactéries, et enfin des sidérophores. Les sidérophores bactériens favorisent la captation du fer : après formation d'un complexe fer-sidérophore, celui-ci est internalisé grâce à un récepteur spécifique situé sur la membrane externe de la bactérie. [14].

**Pouvoir pathogène :**

En médecine humaine, les *Escherichia coli* peuvent être de banals commensaux ou d'indiscutables agents pathogènes. Ils peuvent donner lieu à divers types d'infections.

Les *Escherichia coli* sont isolés dans 20% des septicémies et représentent 45% des septicémies dues aux bacilles à Gram négatif. Les méningites sont rares, elles surviennent surtout chez le nourrisson mais sont souvent graves. Il est remarquable que 80% des *Escherichia* isolés de méningites possèdent l'antigène K<sub>1</sub> [14]

**Eléments thérapeutiques :**

*Escherichia coli* n'est plus le germe uniformément sensible des débuts de l'antibiothérapie. Les aminopénicillines sont souvent inactives, principalement à l'hôpital. Le phénotype sauvage sensible aux 7 groupes de  $\beta$ -lactamines représente 2/3 des souches. Le phénotype pénicillinase de haut niveau (10% des souches) entraîne une résistance aux aminopénicillines et carboxypénicillines ; l'acide clavulanique ne restaure que partiellement l'activité et les autres  $\beta$ -lactamines sont plus ou moins touchées selon leur degré de stabilité aux pénicillinases. [14].

**Diagnostic biologique :**

C'est un diagnostic bactériologique direct avec recherche du germe dans le sang, les urines, le liquide céphalo-rachidien ou les divers. L'isolement est suivi d'une identification et d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Dans les selles où la flore aérobie est constituée essentiellement par *Escherichia coli*, la recherche de souches pathogènes spécifiques est fondée sur la mise en évidence d'antigènes particuliers aux *Escherichia coli* entéro-pathogènes mais qui a perdu beaucoup de son intérêt clinique. La mise en évidence des entérotoxines pour les *Escherichia coli* entérotoxigènes

ne peut être faite que par des laboratoires spécialisés, par exemple par génétique moléculaire ; il en est de même pour la recherche des adhésines. Dans les infections urinaires la recherche des adhésines, marqueur de pathogénicité, n'est pas de pratique courante. [14].

### III. 2. 2. *Haemophilus influenzae* :

*Haemophilus influenzae* est décrit pour la première fois en 1892 par PFEIFFER bactériologue Allemand qui l'isole dans le pharynx de la plupart des malades atteints de grippe. Ce bacille à Gram négatif agent supposé de la grippe (*influenzae*) reçoit le nom générique d'*Haemophilus* car il exige pour sa croissance des milieux enrichis au sang. Par la suite la reconnaissance de la responsabilité de *Haemophilus influenzae* dans la survenue d'autres infections (pneumonies, méningites) a été démontrée. La mise en évidence d'autres espèces d'*Haemophilus*, la découverte en 1931 du virus de la grippe porcine et de son agent de surinfection *Haemophilus suis* et surtout l'isolement en 1933 du virus de la grippe *Myxovirus influenzae* amènent à corriger l'erreur d'interprétation initiale. [11].

#### Caractères bactériologiques :

*Haemophilus influenzae* est un hôte exclusif des muqueuses de l'homme principalement au niveau des voies aériennes supérieures.

#### Caractères morphologiques :

*Haemophilus influenzae* est un bacille à Gram négatif, immobile de petite taille (0,5- 2,5  $\mu\text{m}$  x 0,2  $\mu\text{m}$ ), pleiomorphe souvent coccobacillaire prenant parfois une structure filamenteuse, notamment en cas de carence en facteur de croissance. Certaines souches peuvent présenter une capsule qui accroît leur virulence ou des fimbriae qui leur confèrent des propriétés hémagglutinantes.

#### Caractères culturaux :

*Haemophilus influenzae* ne peut pousser que sur des milieux de culture enrichis en sang, lequel apporte les 2 facteurs de croissance indispensables qui sont l'hémine (ou facteur x) et le NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide ou facteur v), cette double exigence permet de le distinguer d'autres espèces et notamment *Haemophilus parainfluenzae*. Après 24 H de culture à 37°C sur gélose chocolat *Haemophilus influenzae* donne des colonies Smooth, convexes, grisâtres, translucides de 0,5 à 1mm. Les souches capsulées donnent des colonies

mucoïdes de plus grande taille, incandescentes en transillumination obliques. Toutes les espèces nécessitent pour leur croissance une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

#### **Caractères biochimiques :**

Huit biotypes (I à VIII) ont été définis pour l'espèce *Haemophilus influenzae* à partir des caractères biochimiques : production d'indole, l'existence des activités enzymatiques lysine et ornithine décarboxylase. [11].

*Haemophilus influenzae b* possède une nitrate réductase. Il présente des réactions de catalase et d'oxydase variables. Il utilise les hydrates de carbone par un processus fermentatif. [ 17]

#### **Caractères antigéniques :**

Le sérotypage d' *Haemophilus influenzae* repose sur l'étude de la structure antigénique de la capsule du germe. On distingue ainsi 6 variétés antigéniques, a, b, c, d, e, f.

On comprend que les souches d' *Haemophilus influenzae* dépourvues de capsule ne peuvent être sérotypés. En clinique c'est le sérotype b qui est le plus fréquemment rencontré. [11].

#### **Pouvoir pathogènes d' *Haemophilus influenzae* :**

Il est actuellement admis que le point de départ d'infection à *Haemophilus influenzae* quelle que soit sa localisation se fait à partir du réservoir pharyngé. Du portage à l'infection systémique différentes étapes se succèdent.

- adhésion
- colonisation
- prolifération au niveau des muqueuses où *Haemophilus influenzae* détermine des lésions locales à l'origine de l'invasion puis de la dissémination hémotogène des germes. Les facteurs de virulence de la bactérie à chacune de ces étapes ne sont pas parfaitement connus malgré l'apport des études de physiopathologie expérimentales chez l'animal en particulier chez le rat. [11].

#### **Sensibilité aux antibiotiques :**

L'ampicilline n'est active que sur les souches non sécrétrices de bêta- lactamase et ces souches se recrutent essentiellement parmi les souches capsulées de sérotype b.

Les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération sont inactives sur *Haemophilus influenzae* à l'exception de certaines céphalosporines orales.

**Caractères bactériologiques :**

Les méningocoques ont la forme d'une coque ovoïde mesurant de 0,8  $\mu\text{m}$  à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ils forment des diplocoques ressemblant à deux grains de café au nombre de 2 à 8 dans un leucocyte. Comme toutes les *Neisseria* les méningocoques sont à Gram négatif.

Si *Neisseria meningitidis* se trouve à l'état pur dans le produit biologique, par exemple LCR ou sang, on a intérêt à utiliser un milieu non sélectif du type gélose "chocolat" (gélose au sang cuit), que l'on incubera dans une atmosphère humidifiée en présence de 8 à 10% de  $\text{CO}_2$ , température optimale 37° et le pH entre 7,0 -7,2. Le méningocoque n'est pas exigeant en  $\text{CO}_2$ , mais ce gaz facilite sa croissance. Dans un nombre important de cas, l'isolement du méningocoque se fera grâce à une hémoculture incubée dans des conditions d'aérobiose. C'est parfois le seul moyen, en particulier dans les formes graves, d'isoler l'agent causal. Cette méthode a été rendue plus sensible par l'emploi de glucose marqué au  $^{14}\text{C}$  [16].

En bouillon ascite le méningocoque se développe lentement. Il donne un trouble léger vers le deuxième et troisième jours.

Sur gélose ascite le microbe se développe plus rapidement.

Sur gélose au sang : les colonies sont blanchâtres et assez épaisses. De meilleurs résultats ont été trouvés avec les milieux suivants :

Milieu de Mueller Hinton

Milieu au sang cuit (gélose chocolat)

Le méningocoque est un germe très sensible à la dessiccation, à la chaleur au froid et la lumière. Il résiste par contre à la lyophilisation qui devient le seul moyen de conservation.

**Caractères cultureux :**

Les méningocoques se développent aisément sur les milieux solides ou semi-solides contenant du sang, du sérum et se multiplient plus rapidement entre 35 et 37°C et en atmosphère contenant 5 à 10 pour cent de  $\text{CO}_2$ . Ils sont facilement isolés des produits pathologiques lorsque les échantillons fraîchement prélevés sont ensemencés sur des géloses chocolat (au sang cuit) mise à incuber 18 à 24 Heures dans une jarre anaérobie ou dans un dispositif plus complexe des conditions de cultures satisfaisantes.

**Caractères antigéniques :**

Les méningocoques sont divisés en groupes sérologiques sur la base des réactions d'agglutination en présence d'immun sérum. Cela a permis de définir 12 sérogroupe de méningocoques désignés par des lettres majuscules : A, B, C, X, Y, Z, 29E, W135 déjà anciennement connus 4 plus récemment définis H, I, K, L.

Les souches virulentes sont toujours capsulées.

Les sérogroupe A, B, C sont à l'origine de 90% de ces affections. Les autres sérogroupe sont plus volontiers de simples hôtes du rhinopharynx.

**Caractères biochimiques :**

Comme toutes les bactéries du genre *Neisseria*, le méningocoque possède un cytochrome-oxydase et une catalase et ne pousse qu'en aérobiose. Le méningocoque produit une acidification à partir du glucose et du maltose lorsqu'il est ensemencé sur un milieu convenable et ceci toujours de façon oxydative. Certaines peuvent ne pas acidifier le glucose et /ou le maltose, posant alors de problèmes de diagnostic bactériologique [10]. Il réduit parfois les nitrites (68% des souches) mais pas les nitrates. La gamma- glutamyl transférase est positive avec les *Neisseria meningitidis* [1].

**Pouvoir pathogène :**

Les méningocoques pénètrent habituellement dans l'organisme au niveau des voies aériennes supérieures et vont infecter le rhinopharynx. Dans la plus part cette infection est latente mais on observe parfois une inflammation locale qui s'accompagne de quelques symptômes frustrés. La dissémination des méningocoques à partir du rhinopharynx se fait par voie sanguine.

**Pathogénie :**

Du point de vue du pouvoir pathogène, on distingue :

Les méningites à méningocoque, il s'agit de la méningite cérébro-spinale, on isole alors le méningocoque dans le LCR et le sang ;

Les septicémies à méningocoques ;

La méningite est absente ou au deuxième plan des symptômes. On distingue

Des formes aiguës, formes fébriles isolées avec éruptions érythémateuses ou érythématopurpuriques, arthrites.

Des formes suraiguës, tableau clinique du purpura fulminans de Hénoc (ou syndrome de Waterhouse- Friderichsen), avec fièvre, purpura qui s'étend rapidement, hémorragies des muqueuses, collapsus. Malgré le traitement, la mort survient presque toujours en moins de 24 heures.

Il peut aussi être trouvé, avec une fréquence très variable, dans le rhinopharynx des porteurs sains, suivant l'âge de l'individu. Au cours de certaines formes cliniques, on peut aussi le mettre en évidence dans les articulations, sur les conjonctives ou dans les pétéchies. Dans quelques cas il a été identifié au niveau des organes génitaux. Il s'agit d'une bactérie isolée uniquement chez l'homme. [16].

**Sensibilité du germe aux antibiotiques :**

Il est sensible à de nombreux antibiotiques, Pénicilline, Céphalosporine, Chloramphénicol utilisés dans le traitement des méningites cérébro-spinales mais aussi à la Minocycline, la rifampicine, la pristnamycine, les quinolones, les macrolides.

Il est naturellement résistant à la vancomycine et à la colistine utilisée dans la préparation des milieux sélectifs.

La résistance aux sulfamides intéresse l'ensemble des groupes de 10 à 70% des souches isolées.

**Diagnostic :**

Le diagnostic est uniquement direct, reposant sur la mise en évidence du germe et de ces constituants. Il s'agit de bactéries qui nécessitent un transport sans délai au laboratoire.

Les hémocultures doivent être pratiquées chez les patients fébriles, présentant des purpuras et devant tout syndrome méningé. L'examen du LCR sera primordial pour le diagnostic : le LCR est habituellement trouble, pouvant contenir plusieurs centaines d'éléments par  $\text{mm}^3$  à prédominance de polynucléaires. L'examen d'un culot de centrifugation peut permettre l'observation de diplocoques Gram négatif extra ou intracellulaires, mais la densité bactérienne est faible, et l'examen direct est négatif dans un tiers des cas. Dans les infections méningées, on peut pratiquer une recherche d'antigènes capsulaires à partir du LCR. [14].

# **CHAPITRE IV METHODOLOGIE**

## IV. METHODOLOGIE

### IV.1. Cadre d'étude :

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de l'HGT situé en plein centre de Bamako. C'est l'ancien dispensaire central de Bamako, devenu le deuxième hôpital national du pays et qui porte le nom du jeune médecin Malien Gabriel TOURE mort à la tâche. Le laboratoire actuel est l'ancienne pharmacie de l'hôpital réaménagée en laboratoire. Il comprend 2 grandes salles de travail pour l'hématologie et la biochimie, une salle de prélèvement et de parasitologie, une de stérilisation, une salle de garde avec toilette, un bureau de chef de service, 3 salles aménagées récemment pour les activités de bactériologie et équipées en matériels de pointes (2 automates d'hémocultures Bactec 9050, une hote, des congélateurs, des réfrigérateurs, un micro-ordinateur et la communication Internet...). Les activités sont regroupées par section, chaque section dirigée par un interne : section de biochimie, section d'immuno- hématologie, section de parasitologie et une section de bactériologie pour la recherche.

Le personnel comprend :

Un pharmacien biologiste.

Des internes.

Des techniciens supérieures.

Des techniciens de laboratoire. Repartis entre les différentes sections du laboratoire.

Un personnel de surface.

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisés par un Professeur de bactériologie- virologie. L'équipe technique de bactériologie est appuyé par une technicienne supérieure de l'Institut National de Recherche en Santé Publique et comprend en outre le biologiste 2 techniciens et 2 internes.

### IV. 2. Appareillage

#### IV. 2. 1. Présentation de l'appareil Becton Dinckinson BACTEC™ 9050

L'appareil BD Bactec™ 9050 est conçu pour la détection rapide des bactéries et des champignons présents dans les hémocultures cliniques. Les échantillons sont prélevés sur le patient et injectés directement dans les flacons d'hémoculture BD Bactec™ 9050.

Les flacons sont ensuite saisis dès que possible dans l'appareil pour garantir son efficacité.

Lorsque les cultures contiennent des germes, ces microorganismes transforment par métabolisme les éléments nutritifs présents dans le milieu de culture, ce qui entraîne la libération de gaz carbonique dans le milieu. Un colorant incorporé dans le capteur réagit avec le CO<sub>2</sub>. Cette réaction module la quantité de lumière absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les photodétecteurs de l'appareil mesurent le niveau de fluorescence qui correspond à la quantité de CO<sub>2</sub> libérée par les germes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction de paramètres de positivité pré-programmés.

Au démarrage du système, l'appareil BD Bactec™ 9050 effectue des auto-tests de diagnostic et enregistre ses instructions de fonctionnement. L'appareil commence alors à faire des analyses automatisées. Une rangée de diodes électroluminescentes (LED) placées derrière les flacons s'allume, activant ainsi le capteur de fluorescence des flacons. Ensuite les photo détecteurs de l'appareil prennent des mesures. Le cycle d'analyse est de dix minutes. Les cultures positives sont immédiatement signalées par un voyant lumineux sur l'avant de l'appareil, par une alarme sonore installée en option et un affichage sur l'écran à cristaux liquides.

Lorsque les flacons positifs sont identifiés, le technicien de laboratoire les sort de l'appareil pour vérifier les résultats, pour isoler et identifier le germe.

Un appareil peut contenir 50 flacons BD Bactec™. La capacité réelle est de 5 jeux de flacons d'hémoculture par jour avec un protocole d'analyse de cinq jours. Les flacons sont placés sur 3 cercles concentriques désignés par A, B et C. Les flacons, sous incubation constante à 35° C, sont agités afin de permettre la détection d'un maximum de germes.

Les principales caractéristiques de l'appareil BD Bactec™ 9050 sont les suivantes :

- Analyse automatisée, en contenu, et ne nécessitant aucune surveillance des hémocultures ou LCR, par la technologie non-invasive basée sur la fluorescence.
- Intervention et manipulation minimale d'utilisateur.

- Signalement immédiat des positifs par le voyant lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore.
- Interface de l'utilisateur simplifiée, avec des icônes d'aide à l'installation et aux opérations quotidiennes.
- Incubation et agitation de toutes les cultures
- Milieux d'hémoculture BD Bactec™ ayant fait leurs preuves

#### **IV. 2. 2. Mode opératoire**

##### **I. Pour insérer ou réintroduire un flacon :**

1. Ouvrir la porte du Bactec.
2. Appuyer sur la touche «Insertion flacon»
3. Faire lire le code à barres du flacon devant le faisceau lumineux.
4. Insérer le flacon dans l'alvéole indiquée sur l'écran.  
Reprendre les étapes 3 et 4 pour chaque nouveau flacon si d'autres flacons sont à introduire.
5. Fermer la porte.

##### **II. Pour retirer un flacon positif :**

1. Ouvrir la porte
2. Appuyer sur la touche "Retrait des positifs"
3. Retirer le flacon de l'alvéole indiquée à l'écran.
4. Faire lire le code à barres du flacon.  
Reprendre les étapes 3 et 4 pour chaque nouveau flacon positif.
5. Fermer la porte.

##### **III. Pour retirer un flacon négatif :**

1. Ouvrir la porte.
2. Appuyer sur la touche "Retrait des négatifs"
3. Retirer le flacon de l'alvéole indiquée à l'écran.
4. Lire le code à barres du flacon.

Reprendre les étapes 3 et 4 pour chaque nouveau flacon négatif.

5. Fermer la porte.

#### **IV. Pour identifier un flacon anonyme (les tests sont en cours, mais le flacon n'a pas été saisi).**

1. Ouvrir la porte
2. Appuyer sur la touche "Identifier l'anonyme"
3. Retirer le flacon de l'alvéole indiquée à l'écran
4. Lire le code à barres du flacon
5. Replacer le flacon dans l'alvéole indiquée à l'écran  
Reprendre les étapes 4 et 5 pour tout nouveau flacon anonyme
6. Fermer la porte.

#### **V. Pour résoudre une "Erreur de Station" :**

1. Ouvrir la porte
2. Appuyer sur la touche "Résoudre les erreurs"
3. Si un flacon est présent dans cette alvéole, lire son code à barres
4. Si aucun flacon n'est présent dans cette alvéole, appuyer
5. sur la touche d'annulation présenter comme suite  $\diamond \rightarrow$   
Reprendre les étapes 3 et 4 pour chaque station en erreur
6. Fermer la porte.

#### **IV. 3. Protocole de Technique des hémocultures positives :**

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le Bactec 9050 indique que l'hémoculture est positive.

1. On retire la bouteille du Bactec 9050, on désinfecte la capsule en plastique avec de l'alcool, on insère l'aiguille de subculture à travers la capsule, et immédiatement après on prépare une **coloration de Gram** ainsi qu'une **subculture** de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :

- a. Milieu de gélose au sang de cheval ou de mouton
- b. Milieu de gélose Mac Conkey
- c. Milieu de gélose chocolat

On écrit le numéro du Bactec, les initiales du patient ainsi que la date du jour sur chaque boîte.

2. On reporte tous les résultats sur la fiche de travail.

3. On procède à la lecture de la coloration de Gram.

a. Si aucun micro-organisme n'est détecté sur la lame de coloration, on remet la bouteille dans le Bactec 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Au delà de 3 heures de temps passées, le flacon de Bactec devrait être subcultivé sur la boîte de gélose au sang la boîte de gélose Mac Conkey et la boîte de gélose chocolat. Les boîtes et la bouteille sont incubées et observées pendant une durée de 5 jours (à compter du moment de l'incubation de la bouteille). La bouteille est encore subcultivée si au bout de ces 5 jours aucun microorganisme n'a toujours pas été identifié.

b. Si des micro-organismes sont détectés, on ne remet pas la bouteille dans le Bactec 9050. On reporte sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...).

4. On informe le médecin du patient d'un résultat positif de la coloration de Gram.

5. Si des cocci Gram-positif en paires ou en chaînettes sont observés, on place un disque de bacitracine (A) ainsi qu'un disque d'optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture.

6. On place les boîtes contenant les subcultures dans une jarre à bougie, on allume la bougie, on referme le couvercle, et on place la jarre dans l'incubateur.

Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les boîtes.

7. Lorsqu'une croissance est observée, on reporte sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. On fait une coloration de Gram sur ces colonies et on reporte les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs genres de colonies, on reporte l'aspect de chaque colonie bactérienne.

8. Si des cocci Gram-positifs sont observés, on se réfère à l'organigramme de travail. Il s'agit de :

a. Enregistrer les résultats des tests des disques d'optochine et de bacitracine. Faire un test de catalase et enregistrer le résultat sur la fiche de travail.

b. Si le micro-organisme est Catalase-positif et ressemble au Staphylocoque (cocci Gram-positif en grappes), on fait un test de Coagulase. Si le micro-organisme est coagulase-positif il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le micro-organisme est coagulase négatif après (24 heures), il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase Négative.

c. Si le micro-organisme est catalase-négatif, bêta-hémolytique, et bacitracine-positif (inhibé par la bacitracine), on enregistre le micro-organisme comme *Streptococcus Groupe A*.

d. Si le test à la bacitracine ou à la catalase est flou, on fait un PYR test. Si le PYR test est positif, on enregistre le micro-organisme comme étant *Streptococcus groupe A*.

e. Si le microorganisme est catalase négatif, bêta-hémolytique, et bacitracine négatif, on fait des tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. On enregistre le micro-organisme comme étant Streptocoque bêta-hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable.

f. Si le microorganisme est catalase négative, optochine-positif (inhibé par le disque d'optochine) et Gram-positif diplocoque, on enregistre le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant, on fait un test de «bile solubility». Si le test de solubilité par la bile est positif, on enregistre le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae*.

Si le microorganisme ressemble au Streptocoque (catalase négative, cocci Gram-positif en chaînette), est négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, on effectue le PYR test.

Si le résultat du PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Enterococcus species*. Si le résultat du PYR test est négatif, on enregistre le micro-organisme comme étant *Streptococcus* Alpha ou Gamma Hémolytique selon la réaction d'hémolyse.

9. Si le micro-organisme est un bacille Gram-positif, aucun test additionnel n'est effectué. On enregistre seulement «Bacille Gram-Positif ».

10. Si des bactéries Gram-négatif sont observées, on se réfère à l'organigramme ainsi qu'il suit :

a. Si le micro-organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey on fait un test d'oxydase et on inocule une galerie API 20E. Les *Enterobacteriaceae* (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase-négatifs ; les *Vibrio* et *Pseudomonas* sont oxydase positifs. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio* on confirme le résultat par un test de sérotypage. On enregistre le résultat de ces différents tests.

b. Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram-négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, on le confirme par un test de sérotypage.

c. Si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et pas sur la gélose Mac Conkey et se présente comme de petits bacilles Gram-négatif, on peut suspecter *Haemophilus influenzae*. On fait un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, on le confirme par un test de sérotypage.

11. On procède à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques de Kirby-bauer.

12. On enregistre le résultat dans le registre du Bactec et on informe le médecin du patient de l'identification finale.

#### **IV. 4. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries :**

##### **IV. 4. 1. 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 micro-organismes de Gram positif et en micro-organismes de Gram négatif. Les bactéries de Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et auront une teinte bleue au microscope.

Les bactéries de Gram négatif peuvent être 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).

Parce que la coloration de Gram est très importante, elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

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

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

**Procédure de la coloration :**

1. On utilise une lame propre. On écrit le nom du patient et l'identification du spécimen sur la lame avec un crayon de papier. NE PAS utiliser de stylo à bille.

2. On étale l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre. Permettre au frottis de sécher à l'air libre. NE PAS SURTOUT chauffer la lame pour faire sécher rapidement le frottis.

3. Lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher.

4. On recouvre le frottis de lame avec le Violet de Gentiane pendant 30 à 40 secondes.

5. On verse le surplus de la solution de Violet de Gentiane et on rince la lame avec un jet d'eau faible. On égoutte l'excès d'eau. UTILISER un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame.

6. On recouvre le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes.

7. On verse la solution de Lugol de la lame et on la rince avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau.

8. Goutte à goutte, on verse la solution de décolorant alcool-acétone sur la lame de manière à recouvrir le frottis entièrement.

9. Immédiatement après, on rince la lame avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau.

**Note :** Si la solution alcool-acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes Gram positif pourraient apparaître comme Gram-négatif.

10. On recouvre le frottis avec la solution de safranine (ou la fuchsine basique) pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes).

11. On verse la safranine, on rince la lame en la tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau. Prudemment, on sèche la lame avec du papier buvard. NE PAS surtout frotter la lame pour la faire sécher.

### **Interprétation :**

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

### Par exemple

**Cocci Gram-positif en grappes = Staphylocoques**

**Note :** Aucun cocci Gram négatif en grappes n'existe, ainsi les cellules qui apparaissent Gram négatif sont probablement des cocci Gram-positif qui ont été décolorés trop longtemps.

**Cocci Gram-positif en chaînettes = Streptocoques.**

**Note :** Il n'existe pas de cocci Gram- négatif en chaînettes.

**Cocci Gram-positif en paires = Streptocoque pneumoniae ou Entérocoque**

**Note :** Ces cocci sont allongés et attachés par leur bout.

**Bacilles Gram- positif Plusieurs micro-organismes**

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

**Cocci Gram-négatif en paires = Neisseria**

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

**Bacilles Gram-négatif = Plusieurs micro-organismes**

**Note :** Il existe plusieurs bacilles Gram-négatif comprenant *Haemophilus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

#### IV. 4. 2. 3. Coagulase

##### Principe :

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

##### Matériels et réactifs utilisés :

Plasma de lapin

Tube stérile

Anse

##### Procédure :

On met environ 0.5 ml de plasma pour coagulase dans un tube stérile.

On collecte avec une anse plusieurs colonies bactériennes et on les met en suspension dans le plasma. La réaction se produira plus rapidement si la suspension bactérienne est dense.

On place le tube dans l'incubateur et on l'examine après 2 heures, 4 heures et 24 heures. Si la réaction est positive au bout de 2 ou de 4 heures, il n'est plus nécessaire d'incuber plus longtemps.

##### Interprétation :

**Réaction positive** = Gélification du plasma.

Ceci peut apparaître comme une masse flottante dans le tube ou bien le plasma en entier formera un gel permettant au tube d'être complètement renversé.

Chacune de ces réactions est considérée comme Positive.

**Réaction négative** = pas de prise en masse du plasma au bout de 24 heures.

Staphylocoque aureus peut produire deux enzymes : la Coagulase qui est mesurée dans ce test, et la Staphylokinase qui peut dissoudre le caillot. Il est important d'examiner le tube au bout de 2 ou 4 heures parce qu'un caillot peut se former dans les premières heures et par la suite être dissout par la fibrinolyse. Tout caillot qui se forme est considéré comme une réaction positive.

#### IV. 4. 2. 4. Test à l'optochine (disque P) :

##### Principe :

Le Test à l'optochine est une procédure simple utilisée pour l'identification de *Streptococcus 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 diplocoques Gram-positif qui apparaissent allongés et attachés à leurs bouts. Les colonies sont alpha-hémolytiques, et peuvent apparaître aussi bien sèches que muqueuses.

##### Matériels et réactifs utilisés :

- Disque d'optochine (P)
- Gélose au sang
- Anse
- Jarre à bougie

##### Procédure :

On confirme l'identification de la coloration de Gram du micro-organisme.

On ensemence le micro-organisme 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), on place un disque d'optochine.

On incube la boîte dans un jarre à bougie dans l'incubateur.

Le lendemain de l'incubation, on examine la gélose au sang pour voir l'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque d'optochine. On mesure la zone d'inhibition.

### Interprétation :

**Réaction positive** = inhibition de 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, microorganisme identifié n'est pas *Streptococcus pneumoniae*. Si l'un ou l'autre des tests est positif, l'organisme est identifié comme étant *Streptococcus pneumoniae*.

### IV. 4. 2. 5. Test à la bacitracine (disque A) :

#### Principe :

Le test à la bacitracine est un test utile pour la différenciation des Streptocoques du Groupe A des autres Streptocoques. La plupart des souches de Streptocoque du Groupe A sont inhibées par la bacitracine alors que les autres Streptocoques ne le sont pas. Ce test est seulement fait en cas de Catalase négative, avec les Cocci ayant une hémolyse Bêta sur la gélose au sang.

#### Matériels et réactifs utilisés :

- Disque de bacitracine (disque A)
- Gélose au sang
- Anse
- Jarre à bougie

**Procédure :**

On ensemence une colonie de Streptocoque Bêta-hémolytique sur une boîte de gélose au sang.

Dans la partie contenant le plus d'inoculum (c'est à dire, le premier domaine d'inoculation) on place un disque (A) de bacitracine de 0.4 unité.

On incube la boîte de gélose au sang dans une jarre à bougie pendant la nuit.

Le lendemain de l'incubation, toute zone d'inhibition observée autour du disque de bacitracine sera interprétée comme étant sensible (c'est à dire positif).

**Interprétation :**

**Sensible** = l'inhibition de la croissance autour du disque de bacitracine.

**Résistant** = pas d'inhibition de la croissance.

Les micro-organismes Streptocoques du groupe A, sont inhibés par la bacitracine. Les autres micro-organismes Streptocoques Bêta- hémolytiques ne le sont pas.

**IV. 4. 2. 6. Oxydase :****Principe :**

Le test d'Oxydase est un examen rapide, utilisé pour identifier les bactéries Gram-négatifs. Cet examen est utilisé comme un indicateur redox qui passe d'une teinte incolore (quand c'est réduit) à une couleur violet- foncée (quand c'est oxydé). Les bactéries qui possèdent le cytochrome C sont capables d'éliminer des électrons (oxyde) de cet indicateur redox, cause pour laquelle la couleur change.

**Matériels et réactifs utilisés :**

Papier buvard

Anse

Réactif d'oxydase : Phénylène- diamine

**Procédure :**

On met une goutte de réactif d'oxydase (exemple : un composé de phénylène-diamine) sur un papier buvard.

Sur une gélose au sang, on prélève une colonie bactérienne et on la met sur le papier buvard imbibé de réactif d'oxydase.

**Interprétation : --**

**Réaction positive** = développement d'une couleur violette dans un intervalle de 10 à 30 secondes.

**Réaction négative** = aucune couleur ne se développe au bout de 30 secondes. NE PAS LIRE le test après 30 secondes à cause des faux-positifs qui peuvent se développer.

Le test d'oxydase est très important pour l'identification des bactéries Gram-négatif. Les bactéries oxydase positives les plus connues sont *Neisseria*, *Haemophilus*, *Vibrio*, et *Pseudomonas*. Les bactéries oxydase négatives les plus connues sont les *Enterobacteriaceae*, une grande famille de bactéries qui inclut *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*...

**IV. 4. 2. 7. Facteurs X et V de Croissance des *Haemophilus* :**

Un test simple pour l'identification de l'espèce commune des *Haemophilus* est de déterminer leurs exigences pour les facteurs X (Hémine) et V (NAD).

**Matériels et réactifs utilisés :**

Gélose tryptic de soja (TSA) sans sang

Disques de facteurs V, X et X+V

Pinces pour antibiotique

**Procédure :**

1. Pour de petits coccobacilles Gram négatifs ou d'autres micro-organismes suspectés d'être des *Haemophilus*, il fautensemencer ces micro-organismes sur une gélose tryptic de soja (TSA) sans sang.

Si le micro-organisme pousse sur la gélose de sang de cheval mais pas sur la gélose Mac Conkey, on prend une colonie isolée vers le bas de la gélose et puis on ensemence toute la surface de la gélose TSA avec cette gélose.

2. On place immédiatement des disques X, V et XV sur la gélose. Les disques doivent être bien séparés.

3. On incube la boîte de gélose dans un jarre à bougie pendant une nuit.

4. On enregistre la croissance ou l'absence de croissance autour de chaque disque.

**Interprétation :**

1. Croissance autour du disque XV mais pas autour des disques X ou V, et il n'y a pas d'hémolyse sur la gélose au sang = *Haemophilus influenzae*.

2. Ensuite on procède aux tests d'agglutination pour déterminer s'il s'agit du type b.

Toute autre modèle de croissance = *Haemophilus species*.

**IV. 4. 2. 8. Galérie API 20 E :****Principe :**

Le système d'identification API 20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatif qui poussent facilement. Le système consiste en une galerie de 20 micro tubes contenant les substrats déshydratés. Les micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant la nuit dans un incubateur en aérobie, et ensuite interprétés.

**Matériels et réactifs utilisés :**

Support plastique API 20 E

Flacon d'eau distillée

Coffret Galerie 20 E

Ampoule de suspension médium

Anse

Pipette à sérum stérile

Huile de paraffine

Kit de réactifs de révélation (TDA, VP<sub>1</sub>, VP<sub>2</sub>, IND, NIT<sub>1</sub>, NIT<sub>2</sub>)

**Procédure :****1. Préparation de la galerie**

a. On place le support plastique API sur la table et on ajoute assez d'eau pour couvrir à peine le bas du support.

b. On retire la galerie API 20E de son paquet et on le place dans son support.

**2. Préparation de l'inoculum**

c. On casse une ampoule pour la préparation de la suspension. Pour ce faire :

I. Tenir l'ampoule dans une main avec le plastique blanc faisant face.

II. Placer le pouce sur la capsule blanche et la pousser vers le bas aussi loin que possible.

III. Placer le pouce sur la capsule et pousser ceci jusqu'à ce que l'ampoule à l'intérieur de la capsule soit cassée.

IV. Retirer soigneusement la capsule et le bout de l'ampoule.

d. En utilisant une anse on prend une seule colonie de la gélose au sang (pas sur la gélose de Mac Conkey) et on fait une suspension de la colonie dans la solution pour la préparation de la suspension. Aucun grumeau des micro-organismes ne devrait être présent dans la suspension.

e. En utilisant une pipette à sérum stérile, on inocule la galerie API 20E.

I. Les micro tubes se composent d'un tube (partie au-dessous du plastique clair) et la cupule (partie au-dessus du micro tube qui est ouverte et exposée).

II. Pour le CIT (micro tube numéro 5), le VP (micro tube numéro 10) et le GEL (micro tube numéro 11), remplir tube et cupule.

III. Pour tous les autres micro tubes, remplir seulement le tube. NE PAS remplir la cupule.

IV. Ajouter l'huile minérale dans les cupules des cinq micro tubes suivants : ADH (micro tube numéro 2), LDC (micro tube numéro 3), ODC (micro tube numéro 4), H<sub>2</sub>S (micro tube numéro 6) et Urée (micro tube numéro 7).

On place le couvercle sur le support et on incube la galerie pendant 18 à 24 heures dans l'incubateur en aérobiose. Ne pas placer la galerie dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> (en anaérobiose).

3. Lecture de la galerie : on procède comme suit

a. Reporter le résultat de l'oxydase qui a été fait sur les colonies de la gélose au sang et enregistrer ce résultat sur la feuille de résultat de l'API 20E.

b. Enregistrer tous les résultats exceptés ceux de TDA (micro tube numéro 8), IND (micro tube numéro 9) et VP (micro tube numéro 10).

c. Si GLU (micro tube numéro 12) et au moins 3 autres cupules sont positives, ajouter les réactifs suivants :

I. Une goutte de la solution de chlorure ferrique au micro tube TDA. Une coloration brun-foncée est un résultat positif. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.

II. Une goutte du réactif de KOVACS ou réactif de JAMES au micro tube IND. Attendre 2 minutes. Une teinte rouge en cercle est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.

III. Une goutte d'hydroxyde de potassium (VP<sub>1</sub>) et une goutte du réactif VP<sub>2</sub> (ou alpha-naphtol) au micro tube de VP. Attendre 10 minutes. Une couleur rose est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.

IV. Deux gouttes d'acide sulfanilique et deux gouttes du réactif Diméthyl-1-Naphthylamine au micro tube GLU. Attendre 3 minutes. Une couleur rouge est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat (NO<sub>2</sub>).

Si le tube est négatif (jaune) ajoutez une pincée de la poudre de zinc. Attendre 5 minutes. Si le tube reste jaune, le test de N<sub>2</sub> est positif. Enregistrer-le sur la feuille de résultat (N<sub>2</sub>).

Si cette réaction tourne au rouge, elle est négative.

d. Si le micro tube GLU est négatif et le nombre de tests positifs est moins de 3, NE PAS lire le test. Dans ce cas, la galerie API doit- être incubée au moins 24 heures de plus. Si après ce temps, le micro tube GLU reste encore négatif et le nombre de tests positifs reste encore inférieur à 3, alors le micro-organisme peut-être notifié comme étant un bacille Gram négatif à oxydase positive ou négative et l'échantillon doit être envoyé à l'Université de Maryland pour identification.

e. L'antibiogramme doit toujours être fait.

On calcule le profil numérique.

f. Sur la feuille de résultat, les tests sont regroupés par groupe de 3. Des résultats positifs pour le premier micro tube ont une valeur de 1 ; une valeur de 2 pour le deuxième micro tube ; et une valeur de 4 pour le troisième micro tube. Un résultat négatif a une valeur de 0.

g. Les valeurs pour chaque groupe de trois réactions sont additionnées ensemble et peuvent être de 0 à 7.

h. Ceci est fait pour chacun des 7 groupes de trois réactions. Ceci forme un nombre à 7 chiffres.

4. L'identification du micro-organisme est alors effectuée par la recherche des 7 chiffres dans le catalogue de référence de l'API 20E. Les 7 chiffres doivent correspondre exactement.

Toutes identifications avec Acceptable, Bon, Très Bonne ou Excellente peuvent être enregistrées. Des tests supplémentaires peuvent être exigés si l'identification est faiblement discriminant ou a une faible probabilité.

Dans le cas où les 7 chiffres ne correspondent pas exactement, vérifier que la colonie est pure. Si ceci est exact, alors reprendre la procédure d'identification de la galerie API comme résumer ci-dessus au début. Si malgré cela les 7 chiffres ne correspondent toujours pas exactement à un nombre du catalogue d'identification API, alors téléphoner au représentant API. Si on est incapable de joindre cette personne, alors le micro-organisme peut-être notifié comme étant un bacille Gram négatif à oxydase positive ou négative, on le conserve et un échantillon est envoyé à l'Université de Maryland pour identification.

#### **IV. 4. 3. Tests immunologiques :**

##### **IV. 4. 3. 1. Tests d'agglutination des Streptocoque Bêta-hémolytique :**

Ce test est réalisé avec un réactif appelé Slidex strepto-Kit, qui est un test d'agglutination de particules de latex pour le groupage rapide des streptocoques  $\beta$ -hémolytiques A, B, C, D, F, et G de LANCEFIELD. Ce test permet une identification rapide et facile des colonies de streptocoques  $\beta$ -hémolytiques isolées de primo-cultures.

##### **Résumé et explication du test :**

Les streptocoques  $\beta$ -hémolytiques possèdent le plus souvent des antigènes spécifiques du groupe qui peuvent être extraits et identifiés avec des sérums de groupe.

Ainsi les réactifs constitués de particules de latex sensibilisés par des anticorps dirigés contre les antigènes se lient aux antigènes correspondants entraînant une agglutination visible des particules de latex.

#### **Principe du test :**

Slidex strepto-Kit un test d'agglutination de particules de latex pour le groupage et l'identification des Streptocoques  $\beta$ - hémolytiques des groupes A, B, C, D, F, et G.

Après culture sur gélose au sang, les colonies isolées de Streptocoques  $\beta$  hémolytiques sont prélevées et placées dans un tube contenant le réactif d'extraction.

L'antigène spécifique de groupe contenu dans la paroi est extrait enzymatiquement selon une technique simple et rapide. L'antigène spécifique est identifié par des particules de latex sensibilisées par un anticorps anti-antigène du groupe des Streptocoques. Si l'antigène est présent, le réactif latex correspondant est agglutiné. Si l'antigène est absent, le réactif latex reste en suspension homogène.

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

Tube à hémolyse

Anse

Pipettes Pasteur

Pipettes graduées

Agitateur type Vortex

Bac désinfectant

Slidex strepto-Kit

#### **IV. 4. 3. 2. Sérotypage des Salmonella :**

##### **Principe :**

Les bacilles Gram négatifs qui sont identifiés comme *Salmonella* (selon le résultat de la galerie API 20E) doivent être confirmés en démontrant leur agglutination avec un antiserum spécifique. Ceci est fait en faisant réagir les micro-organismes avec un antiserum O polyvalent et antiserum Vi. Tous les *Salmonella* réagissent avec l'antiserum O (spécifique pour le carbohydrate O antigène présent dans les *Salmonella*) et les *Salmonella Typhi* réagissent avec

l'antisérum Vi (une capsule thermolabile, antigène présent sur *Salmonella Typhi*). Dans quelques cas le Vi peut bloquer les réactions avec le O (c'est à dire aucune réaction avec O et agglutination avec Vi ). Dans ce cas, du chauffage de la suspension bactérienne résultera une agglutination avec l'antisérum O (l'antigène O est thermostable) et aucune agglutination avec l'antisérum Vi (les Vi antigènes sont thermolabiles).

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

Anse stérile  
Tube à essai  
Solution saline  
Boîte de pétri stérile  
Antisérum O de *salmonella*  
Antisérum Vi  
Chronomètre

#### **Procédure :**

1. En utilisant une anse stérile, on transfère 4 ou 5 colonies bien isolées dans un tube à essai contenant 1ml de solution saline.
2. On mélange les colonies bactériennes jusqu'à ce qu'une suspension dense soit obtenue ne contenant pas de grumeaux de colonies bactériennes visibles.
3. On place une goutte de la suspension bactérienne sur chacun des deux domaines d'une boîte de pétri stérile.
4. On place un dépôt d'antisérum O de *Salmonella* dilué à côté du premier dépôt de la suspension bactérienne. On place un dépôt d'antisérum Vi de *Salmonella* tout proche du deuxième dépôt de la suspension bactérienne.
5. On mélange les deux paires de dépôts avec une anse stérile, chaque dépôt restant dans son cercle respectif. Ne pas permettre aux deux paires de se mélanger l'une à l'autre. Alors doucement on penche la boîte de pétri du test de long en large pendant 1 minute. On observe pour l'agglutination.

6. Si la réaction du sérum polyvalent de O est négative (aucune agglutination) mais la réaction de Vi est positive, on fait bouillir de l'eau et on y place alors le tube d'examen avec la suspension bactérienne. On laisse bouillir pendant 15 minutes. On enlève le tube et on le laisse se refroidir à la température de la salle.

7. On répète les examens avec le sérum O polyvalent et le sérum Vi.

### Interprétation :

1. Si la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* donne une agglutination et en plus la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum Vi ne donne aucune agglutination, le résultat est : *Salmonella species*  
(On reporte comme tel le résultat donné par la galerie API 20 E )

2. Si la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* donne une agglutination et en plus la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum Vi donne aussi une agglutination, le résultat est : *Salmonella typhi*

3. Si la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum O Polyvalent de *Salmonella* ne donne aucune agglutination et que la suspension bactérienne non chauffée + l'antisérum Vi donne une agglutination ; on chauffe alors la suspension bactérienne.

Si la suspension bactérienne chauffée + l'antisérum O polyvalent de *Salmonella* donne une agglutination et en plus la suspension bactérienne chauffée + l'antisérum Vi ne donne aucune agglutination, le résultat est : *Salmonella typhi*.

Si la suspension bactérienne chauffée + antisérum O Polyvalent de *Salmonella* ne donne aucune agglutination et en plus la suspension bactérienne Chauffée + l'antisérum Vi ne donne aucune agglutination, le résultat est une autre bactérie (mais pas *Salmonella*).

**N. B :** Si tel est le cas, vérifier que la culture est pure. Si cela s'avère, alors il faut reprendre la galerie API 20 E. Si l'identification donne *salmonella* et le test d'agglutination indique toujours qu'il ne s'agit pas de *salmonella* alors on le reporte comme un microorganisme à oxydase négative, bacille à Gram négatif et on le garde en vue de l'envoyer à l'université de Maryland pour identification.

**Prudences :**

Uniquement exécuter les examens d'agglutination si la galerie API 20E indique que le micro-organisme est une *Salmonella* parce que d'autres bactéries peuvent réagir avec l'antisérum polyvalent

**IV. 5. Test de Sensibilité des 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 approprié 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 micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du micro-organisme. 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 concentration du micro-organisme 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 si non les résultats ne seront pas précis.

**Matériels et réactifs utilisés :**

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

Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)

Solution saline stérile à 0,85 ‰

Standard 0,5 de Mc Farland

Disques antibiotiques pour test de sensibilité

Ecouvillons en coton stériles

Pipettes à sérum

Pinces à disques et/ ou applicateur de disque

**Conditions de stockage nécessaires :**

1. Milieux de culture (MHA-B et HTM) : A conserver au réfrigérateur, ils doivent être réchauffés à la température de la salle avant leur utilisation. Les boîtes non-stockées dans des sacs en plastique se déshydrateront et ne pourront pas être utilisées convenablement.

2. Solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur.

3. Standard 0.5 de Mc Farland : 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.

4. Disques d'antibiotiques : Congeler les disques à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à une température plus basse pour de longue conservation.

5. 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 :**

1. Les boîtes de gélose doivent être réchauffées à la température de la salle avant qu'elles ne soient inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais de gouttelette d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le micro-organisme.

2. La gélose HTM (gélose spéciale pour *Haemophilus*) est utilisée pour les tests *haemophilus*. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests.

3. On enlève du réfrigérateur les disques pour le test de sensibilité afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle, au paravent 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. On vérifie les dates d'expiration sur les récipients des antibiotiques.

Ne pas utiliser de disques périmés.

4. On sélectionne au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Ne pas sélectionner des colonies de la boîte de gélose Mac Conkey. On touche le sommet de chaque colonie avec une anse et on les transfère dans un tube de solution saline. On ajuste l'inoculum de la solution saline 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.

5. On plonge un écouvillon stérile dans la suspension ajustée. On tourne l'écouvillon plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. On inocule la surface entière de la boîte de gélose en faisant tourner la boîte d'approximativement 60° et on enseme de nouveau. On fait tourner la boîte et on répète l'ensemencement 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.

6. On inocule une boîte pour *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* ; on inocule deux boîtes de gélose pour les autres bacilles Gram négatifs.

7. On laisse l'excès d'humidité s'absorber par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. On place les disques d'antibiotique sur la boîte en utilisant des pinces stériles. On presse le disque 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 dans la gélose immédiatement.

On utilise souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques.

8. Les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

a. Pour *Streptococcus pneumoniae* : Oxacilline 1 µg (pour le test de Pénicilline 10 UI), Céftriaxone 30 µg, Erythromycine 15 µg, Chloramphénicol 30 µg.

b. Pour *Staphylococcus aureus* : Pénicilline 10 UI, Oxacilline 1 µg, Céftriaxone 30µg.

c. *Haemophilus influenzae* : Ampicilline 2 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg

d. Pour les autres bacilles Gram négatif

I. Boîte de gélose N°1- Ampicilline 2 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.

II. Boîte de gélose N°2- Gentamicine 15 µg, Cotrimoxazole 25 µg, Ciprofloxacine 5 µg.

9. On laisse les boîtes pendant 15 minutes après que les disques aient été déposés avant l'incubation proprement dite.

Les espèces *Streptococcus* et *Haemophilus* sont placées dans une jarre à bougie.

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

### Interprétation :

1. 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.

2. On mesure les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte. Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. 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.

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

a. La croissance de larges colonies à l'intérieur d'une zone d'inhibition claire devrait indiquer un mélange de croissance. Si telle est le cas alors la sensibilité est mixée, reprendre le test. Si les colonies persistent dans la zone, il faut les considérer comme significatives.

b. Avec le Cotrimoxazole, 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.

c. On se réfère à la « carte de référence » pour l'interprétation des tests.

d. Les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 1 µg est utilisé. Ne pas reporter les résultats comme Oxacilline mais plutôt les reporter comme Pénicilline.

#### Compte-rendu :

1. Reporter les résultats dès que l'identification du micro-organisme est complète.

2. Si le profil de sensibilité est atypique pour le micro-organisme identifié, l'identification et le test de sensibilité devraient être repris. Si les résultats restent atypiques, ils pourraient être discutés avec le superviseur du laboratoire ou le directeur avant de les reporter.

3. Quelques résultats avec les tests des disques de diffusion pourraient être irréalisables. Les micro-organismes fastidieux ou lents en croissance ne pourraient pas être testés par la méthode. En plus, des combinaisons de micro-organismes et d'antibiotiques ne peuvent pas être testés de façon fiable avec la méthode de diffusion des disques. Les guides suivants seraient utilisées pour ces micro-organismes :

a. Reporter comme résistants tous les tests de *Salmonella* et *Shigella* avec des Aminoglycosides et les Céphalosporines de première et seconde générations.

b. Si le *Staphylococcus* est résistant à l' Oxacilline, reporter Penicilline et Céftriaxone comme résistants sans tenir compte de ce que le test du disque indique.

#### IV. 6. Conservation des cultures pures : [6]

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence. Elles sont fréquemment utilisées soit pour l'enseignement, soit pour le contrôle, soit pour la recherche. L'intérêt de se référer à des souches standards est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis. En Angleterre, la plus connue est la «National Collection of Type Cultures» (NCTC). En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris. Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître.

Deux possibilités sont offertes aux collectionneurs pour maintenir les souches en survie et leur conserver toutes leurs propriétés. On peut simplement les cultiver sur des milieux adaptés et les transférer périodiquement sur des milieux neufs. Il est nécessaire de bien connaître le milieu le plus convenable, la température la plus favorable et la durée limite de stockage. Les précautions élémentaires suivantes sont prises pour assurer cette conservation :

1. La dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou mieux en les scellant au chalumeau.
2. La culture est conservée à l'abri de la lumière ou à la température du laboratoire ou dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+4°C).
3. Le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée, ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot, ensemencée par piqûre centrale.

Ainsi peut-on procéder avec les bactéries à croissance rapide comme le sont les Entérobactéries, les Staphylocoques, etc. Pour de nombreux autres germes, on aura recours à des milieux particuliers : sérum coagulé pour les *Corynébactéries*, gélose pomme de terre pour les *Brucellae*, gélose sans peptone pour les *Bacillus*, etc.

Les souches isolées dans notre cas d'étude sont conservées par congélation.

Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent sa mise en œuvre : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.

Pour conserver dans les meilleures conditions les structures cellulaires, il convient de les congeler à la température la plus basse et d'y parvenir dans les délais les plus brefs.

Nos souches sont conservées dans un congélateur de  $-65^{\circ}\text{C}$  à  $-90^{\circ}\text{C}$ .

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D
N° B-P
N° D et N G I
I M /E <sub>2</sub>

E : Etage du congélateur

B : Bloc

T : Tiroir

D : Date

N° B-P : numéro de la boîte et position de la souche

N° D et N G I : numéro de dossier du patient et germe isolé

I M /E<sub>2</sub> : initiale du patient /Etude2

#### IV. 7. Eléments de l'assurance qualité

Les procédures suivantes sont suivies :

1. L'identification des spécimens
2. L'enregistrement dans les registres de travail
3. La saisie des résultats
4. Le contrôle de qualité consistant en

### a. Le suivi des appareils

**1. Relevé des température quotidiennes :** On procède à un relevé quotidien de température :

- Congélateur de conservation des souches, intervalle de température – 65 à – 90°C.
- Congélateur de conservation des antibiogramme, intervalle de température – 20 à – 30 °C.
- Réfrigérateurs de conservation des réactifs et milieux de cultures, intervalle de température 2,8 à 8 °C.
- Relevé de température des automates Bactec.

### 2. Suivi du niveau d'eau de l'incubateur

Des flacons d'eau distillée stérile en vue du ravitaillement en eau de l'incubateur

**3. Nettoyage des filtres :** Les filtres situés sur les côtés latéraux des Bactec sont nettoyés tous les 15 jours.

### 4. Contrôle de la turbidité de l'appareil Mc Farland

**5. Contrôle des jarres à bougie :** On procède a la culture sous jarre des germes aéro-anaérobies. On provoque l'anaérobiose en fermant la jarre avec une bougie allumé. La bougie s'éteint au bout d'un certains temps après avoir consommé l'oxygène contenue dans la jarre.

### b. Le contrôle de la qualité des réactifs et milieux de cultures :

Les réactifs et les milieux de cultures sont contrôlés sur des souches de références :

- |                                       |                 |
|---------------------------------------|-----------------|
| - <i>Streptococcus pneumoniae</i>     | A T C C 49619 ; |
| - <i>Haemophilus para- influenzae</i> | A T C C 7901 ;  |
| - <i>Haemophilus influenzae</i>       | A T C C 49247 ; |
| - <i>Streptococcus groupe B</i>       | A T C C 12386 ; |
| - <i>Staphylococcus aureus</i>        | A T C C 25923 ; |
| - <i>Streptococcus groupe A</i>       | A T C C 19615 ; |
| - <i>Escherichia coli</i>             | A T C C 25922   |

Il s'agit :

1. Des milieux de culture : gélose au sang de mouton ou de cheval, gélose Mac Conkey, Mueller Hinton, gélose chocolat, gélose trypticase soja.
2. Des réactifs qui permettent la réalisation des techniques suivantes :  
Coloration de Gram,  
catalase, coagulase, oxydase, réactifs de révélation de la galerie API 20 E,
3. Des disques : facteurs X, V et X+V, disque d'optochine, disque de bacitracine

## V. RESULTATS :

Les résultats sont présentés et analysés de la manière suivante :

Seul le résultat de la culture finale a été pris en compte pour les germes.

Les Bacilles Gram Positifs (BGP) et les *Staphylococcus* Coagulase Négatif (SCN) sont des contaminants des hémocultures.

Les résultats sont présentés ainsi qu'il suit :

- L'ensemble des germes pathogènes isolés des hémocultures
- L'ensemble des contaminants
- L'ensemble des cultures stériles
- Le total du prélèvement effectué pendant le mois
- Le suivi de l'évolution des contaminants

Les résultats discordants du bouillon Bactec positif et les cultures finales stériles sont rarement rencontrés.

Certains bouillons Bactec positifs n'ont pas donné de résultats finales, pour motif de culture non effectuée. Seul le résultat du Gram a été rendu.

## V. 1. RESULTATS DES HEMOCULTURES DU MOIS DE FEVRIER

PERIODE du 19 au 28 Février 2002

Tableau 1. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	35	76,03
Positifs	11	23,91
<b>Total des prélèvements</b>	<b>46</b>	<b>100,0</b>

Tableau 2. RESULTATS DE LA COLORATION DE GRAM

Gram-	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs	0	0
Gram positifs	11	100,0
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>100,0</b>

Tableau 3. RESULTATS DES GERMES ISOLEES

Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Salmonella Typhi</i>	3	37,5	37,50
<i>Salmonella spp</i>	2	25,0	62,50
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	25,0	87,50
CoccoBacille Gram Négatif	1	12,5	100,0
<b>Total des germes</b>	<b>8</b>	<b>100,0</b>	

Nombre de cultures finales stériles : 36 (dont un bouillon Bactec positif a été stérile en culture finale) soit 78,26 %

Nombre de contaminants : 2 soit 4,35 %

Pendant cette décade de février 3 types de germes sont isolés ; il s'agit de *Salmonella* ( 62,50%) , *Streptococcus pneumoniae* (25%) et un cas de coccobacille Gram négatif.

Nombre de cultures stériles : 159 soit 68,53 %

Nombre de contaminants : 35 soit 15,09 %

Pendant cette période de Mars 2003 les principaux germes responsable de méningites et/ou de septicémies (7 cas de *Streptococcus pneumoniae*, 3 cas d' *Haemophilus influenzae type b* et 1 cas *Neisseria meningitidis* ) prédominent. 11 cas de Salmonellose sont détectés.

## V. 3. RESULTATS DES HEMOCULTURES DU MOIS D'AVRIL 2002

Tableau 7. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	168	78,5
Positifs	46	21,5
<b>Total des prélèvements</b>	<b>214</b>	<b>100,0</b>

Tableau 8. RESULTATS DE LA COLORATION DE GRAM

Gram	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs,	0	0
Gram Positifs	46	100,0
<b>Total</b>	<b>46</b>	<b>100,0</b>

Tableau 9. RESULTATS DES GERMES ISOLES

Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7	21,88	21,88
<i>Streptococcus non pneumoniae</i>	2	6,25	28,13
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	1	3,12	31,25
<i>Salmonella Typhi</i>	5	15,63	46,88
<i>Salmonella Paratyphi B</i>	3	9,38	56,26
<i>Salmonella spp</i>	2	6,25	62,51
<i>Haemophilus influenzae b</i>	3	9,38	71,89
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	9,38	81,27
<i>Escherichia coli</i>	3	9,38	90,65
<i>Citrobacter freundii</i>	1	3,12	93,77
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	3,12	96,89
<i>Serratia spp</i>	1	3,12	100,0
<b>Total des Germes</b>	<b>32</b>	<b>100,0</b>	

## V. 8. RESULTATS HEMOCULTURES DU MOI DE SEPTEMBRE 2002

Tableau 22. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	107	68,59
Positifs	49	31,41
<b>Total des prélèvements</b>	<b>156</b>	<b>100,0</b>

Tableau 23. RESULTATS DE COLORATION DE GRAM

Gram	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs	03	70,51
Gram positifs	46	29,49
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>100,0</b>

Tableau 24. RESULTATS DES GERMES ISOLEES

Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10	33,34	33,34
<i>Streptococcus du groupe A</i>	1	3,34	36,68
<i>Salmonella spp</i>	6	20,0	56,68
<i>Salmonella Paratyphi B</i>	3	10,0	66,68
<i>Salmonella Typhi</i>	3	10,0	76,68
<i>Haemophilus influenzae b</i>	4	13,34	90,02
<i>Escherichia coli</i>	2	6,67	96,69
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3,34	100,0
<b>Total des germes</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>	

Nombre de cultures stériles : 110 soit 70,51 %

Nombre de contaminants: 16 soit 10,25 %

Les principaux germes sont : Streptocoques ; *Salmonella* ; *Haemophilus*. On note une augmentation de cas d'*Escherichia coli*.

## V. 9. RESULTATS DES HEMOCULTURES DU MOI D'OCTOBRE 2002

Tableau 25. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	174	76,65
Positifs	53	23,35
<b>Total des prélèvements</b>	<b>227</b>	<b>100,0</b>

Tableau 26. RESULTATS DE LA COLORATION DE GRAM

Gram	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs,	0	0
Gram positifs	53	100,0
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>100,0</b>

Tableau 27. RESULTATS DES GERMES ISOLES

Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Salmonella Typhi</i>	9	25,71	25,71
<i>Salmonella Paratyphi B</i>	6	17,14	42,85
<i>Salmonella Paratyphi C</i>	1	2,86	45,71
<i>Haemophilus influenzae b</i>	8	22,86	68,57
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	17,14	85,71
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	8,57	94,28
<i>Neisseria meningitidis W 135</i>	1	2,86	97,14
<i>Escherichia coli</i>	1	2,86	100,0
<b>Total des germes</b>	<b>35</b>	<b>100,0</b>	

Nombre de cultures stériles : 175 soit 77,09 %

Nombre de contaminants : 12 soit 5,29 %

Pendant cette période les Salmonelloses prédominent (45,71%) ; *Haemophilus influenzae b* (22,86%) ; *Streptococcus pneumoniae* (17,14%). On note l'émergence de cas de *Neisseria meningitidis W135*.

## V. 10. RESULTATS DES HEMOCULTURES DU MOI DE NOVEMBRE 2002

Tableau 28. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	141	76,22
Positifs	44	23,78
<b>Total des prélèvements</b>	<b>185</b>	<b>100,0</b>

Tableau 29. RESULTATS DE LA COLORATION DE GRAM

Gram	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs	03	6,82
Gram positifs	41	93,18
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>100,0</b>

Tableau 30. RESULTATS DES GERMES ISOLES

Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Salmonella spp</i>	14	41,18	41,18
<i>Salmonella Typhi</i>	4	11,76	52,94
<i>Haemophilus influenzae b</i>	8	23,53	76,47
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	11,76	88,23
<i>Streptococcus du groupe A</i>	1	2,94	91,17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2,94	94,11
<i>Escherichia coli</i>	1	2,94	97,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2,94	100,0
<b>Total des germes</b>	<b>34</b>		

Nombre de cultures stériles : 144 soit 77,84 %

Nombre de contaminants : 6 soit 3,24 %

On note la prédominance des *Salmonella* (52,94%) ; *Haemophilus influenzae b* (23,53%) ; Streptocoques (11,76%), et un faible taux de contaminants (3,24%).

## V. 11. RESULTATS DES HEMOCULTURES DU MOI DE DECEMBRE 2002

Tableau 31. RESULTATS DU BOUILLON BACTEC

Prélèvements	Fréquence	Pourcentage
Négatifs	89	74,79
Positifs	30	25,21
<b>Total des prélèvements</b>	<b>119</b>	<b>100,0</b>

Tableau 32. RESULTATS DE LA COLORATION DE GRAM

Gram	Fréquence	Pourcentage
Gram négatifs	0	0
Gram positifs	30	100,0
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>100,0</b>

Tableau 33. RESULTATS DES GERMES ISOLES

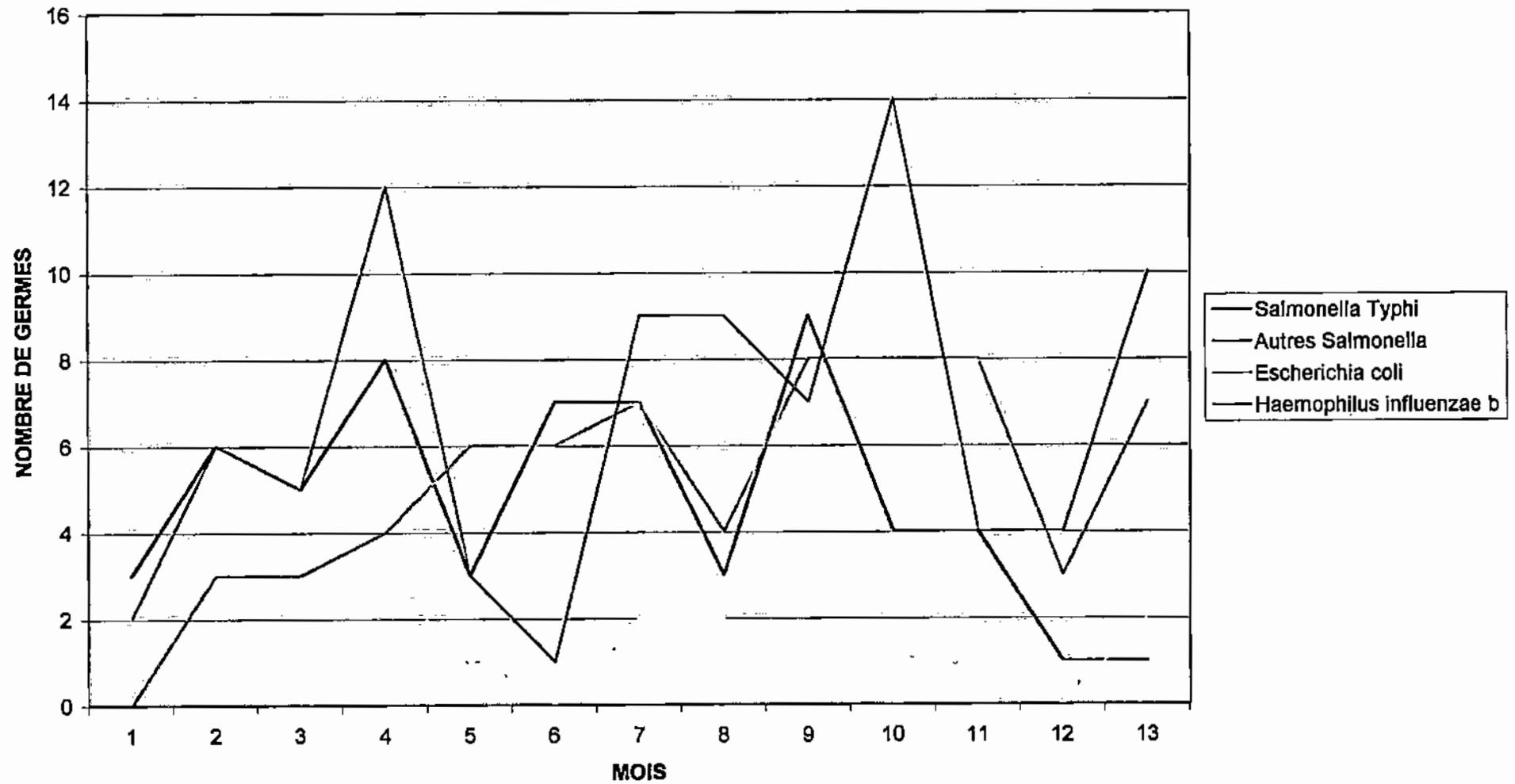
Germes	Fréquence	Pourcentage	Pourcentage cumulé
<i>Haemophilus influenzae b</i>	8	32,00	32,00
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7	28,00	60,00
<i>Salmonella spp</i>	4	16,00	76,00
<i>Salmonella Typhi</i>	4	16,00	92,00
<i>Neisseria meningitidis W 135</i>	1	4,00	96,00
<i>Escherichia coli</i>	1	4,00	100,0
<b>Total des germes</b>	<b>25</b>	<b>100,0</b>	

Nombre de cultures stériles : 89 soit 74,79 %

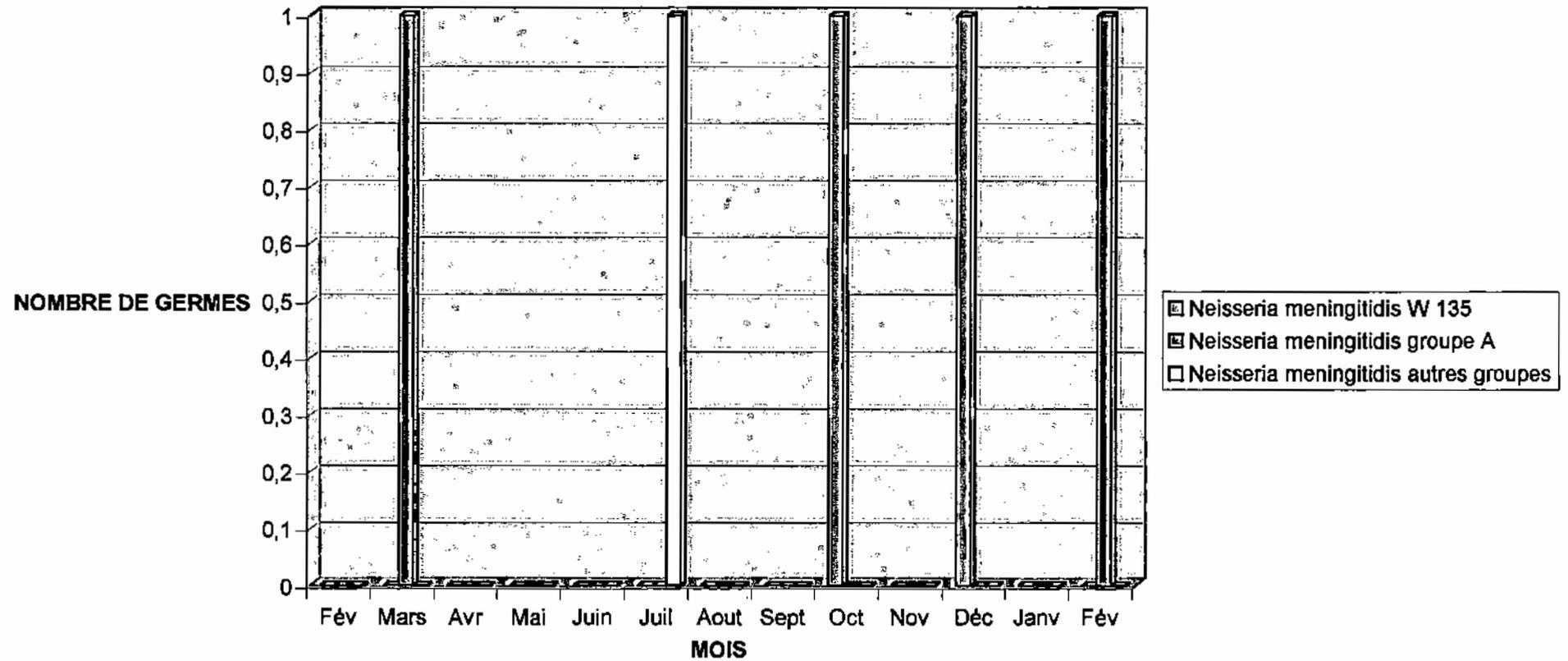
Nombre de contaminants : 5 soit 4,20 %

Les principaux germes (*Haemophilus influenzae type b* 32%, *Streptococcus pneumoniae* 28%, *Salmonella* 32%) sont dans un même ordre de grandeur.

V. 15 : Evolution des principaux germes isolés des hémocultures de février 2002 à février 2003 à l'HGT- figure 2 : Evolution des bacilles Gram négatifs



V. 15. Evolution des principaux germes isolés des hémocultures de février 2002 à février 2003 à l'HGT- Figure 3 : Evolution des souches de *Neisseria meningitidis* (groupe A, W135 et autres groupes)





**CHAPITRE VI**  
**COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS**

## **VI. Commentaires et discussions :**

Cette étude est une étude prospective sur un an basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives dues aux pathogènes responsables de septicémies et/ ou de méningites bactériennes et hospitalisés dans les services de pédiatrie de l'HGT à Bamako (MALI).

Les critères d'inclusion des enfants admis à l'HGT du 19 février 2002 au 28 février 2003 ont porté sur l'âge  $\leq 16$  Ans, la maladie fébrile (température  $> 39^{\circ}\text{C}$ ) et d'autres retenus dans le protocole.

Les prélèvements d'hémoculture sont effectués dans les services de pédiatrie et les flacons de Bactec y sont immédiatementensemencés.

### **VI. 1. Méthodologie :**

Les prélèvementsensemencés sur le bouillon Bactec adapté au développement des germes responsables de septicémies et/ ou de méningites sont alors reçus au laboratoire. Les prélèvements sont identifiés, enregistrés dans les registres de travail. Les flacons du bouillon Bactec sont ensuite saisis dans l'appareil Bactec pour garantir son efficacité.

Les cultures positives dues au métabolisme des microorganismes sont détectées automatiquement grâce à un signal de l'appareil Bactec.

La surveillance de l'hémoculture et la détection des cas positifs sont programmés volontairement pour une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques peuvent aller de 7 à 10 jours .

Les flacons positifs sont techniqués alors conformément à la bactériologie de routine.

La coloration de Gram, technique très importante, est accomplie avec le plus grand soin.

## VI. 2. Résultats :

Au terme de cette étude nous avons obtenu les résultats suivants :

Le nombre total de prélèvements effectués est de : 2198 sur un an. SIDIBE Mayrama a analysé 1113 hémocultures chez 1014 patients de 1993 à 1998, étude réalisée dans le cadre du « bilan de six années d'hémoculture au laboratoire de l'Hôpital National du Point G en 2000 ».

Sur les 2198 prélèvements effectués, le nombre de flacons de Bactec positifs est 585 soit 26,61% des prélèvements.

Le nombre de flacons de Bactec négatifs est de 1613.

Au terme de la première étape de culture, une coloration de Gram est effectuée sur tous les flacons positifs. Les frottis de sang effectués à partir des flacons de Bactec positifs ont donné les résultats suivants :

Le nombre de frottis de sang ayant donné un résultat positif est de 575 soit 98,29% des flacons positifs. Ce taux montre que le type d'incubation et de suivi des bouillons Bactec a une bonne corrélation avec le développement des microorganismes.

La positivité des examens bactériologiques n'est affirmée que sur la base des examens de culture sur les milieux solides d'identification et d'isolement. Ainsi, le nombre de germes après culture et identification est égal au nombre de germes isolés soit 551.

Ce chiffre correspond à 98,75% des flacons positifs et 25,07% de l'ensemble des prélèvements.

Au CHU de Treichville- Abidjan, GRE (TOHOURY Laurent) en 1984 dans une étude portant sur des septicémies avérées a trouvé 26 hémocultures positives sur 36 prélèvements soit 72,22%. [19].

Le nombre de contaminants de notre étude est de 160 soit 7,28%. Ce taux est largement inférieur à la valeur admise 15%.

Il est à noter que 17 flacons de Bactec positifs ont « in fine » donné une culture finale stérile. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que l'appareil Bactec peut détecter

la positivité due à d'autres microorganismes tels que les levures, les parasites (plasmodium...).

La fréquence d'isolement des principaux germes est le suivant :

84 *Streptococcus pneumoniae*, soit 21,48%

67 *Haemophilus influenzae type b* soit 17,14%

61 *Salmonella Typhi* soit 15,6%

31 *Staphylococcus aureus*, soit 7,93%

19 *Escherichia coli* soit 4,86%

2 *Klebsiella pneumoniae* soit 0,51%

5 *Neisseria meningitidis* soit 1,28%

4 *Streptococcus groupe A*, soit 1,02%

On retrouve les principaux germes des hémocultures comme dans les études de GORO Diakaria à Bamako 2002, portant sur les infections nosocomiales, de YARRO Fatimata sur les septicémies à l'HNP "G" à Bamako 2000, et de PAUL IGAMBA de port-gentil (GABON) sur les infections nosocomiales. [20] ; [21] ; [22].

Nature des germes isolés :

- Dans notre étude *Streptococcus pneumoniae* est le chef de file de ces pathogènes, alors que chez d'autres auteurs ce sont les entérobactéries qui prédominent. On observe des pics en février, mai, juillet, septembre.

- Les entérobactéries type *Salmonella Typhi* occupent la deuxième place. La fréquence des *Salmonella* dans la tranche d'âge d'étude (0 à 17 ans) appelle l'analyse suivante en dehors de l'analyse de population ( rapport entre germes et tranches d'âge ). Sur un total de 61 *Salmonella*, 25 sont retrouvés chez les enfants de 0 à 3 ans. Il s'agit d'une situation inhabituelle qui mérite réflexion.

- *Haemophilus influenzae* représente 17,14% des germes totaux. On observe une montée des cas pendant la période octobre, novembre, décembre.

- La fréquence d'isolement des Staphylocoques à coagulase négatifs semble augmentée du fait de l'usage du bouillon Bactec beaucoup plus propice au développement de ces germes. La majorité des SCN isolés par hémoculture sont des contaminants, ce qui pose parfois des problèmes difficiles d'interprétation.[9]

On observe un pic en début d'étude pendant la période février, mars 2002 supérieur à 15%, puis une évolution en dent de scie ; les taux bas correspondant aux périodes d'intense sensibilisation aux prélèvements dans les conditions d'asepsie.

**CHAPITRE VII  
CONCLUSION ET  
RECOMMANDATIONS**

## VII. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :

### VII. 1. CONCLUSION :

A la suite de l'étude rétrospective qui a évalué le nombre d'enfants souffrant de fièvre élevée et admis dans les services de pédiatrie de l'HGT, l'hémoculture a vu le jour dans le laboratoire. Le sang recueilli dans des conditions d'asepsie rigoureuse est ensemencé sur des milieux aéro-anaérobies, souvent sous atmosphère riche en CO<sub>2</sub> de façon classique. L'innovation technologique majeure est l'utilisation pour la première fois de l'automate d'hémoculture le Bactec 9050 BD. Il s'agit d'un appareillage robuste, efficace, simple dans son emploi. La méthodologie mise au point utilise un bouillon Bactec spécialement propice au développement de la plupart des bactéries rencontrées dans les méningites bactériennes pédiatriques. Le flacon est saisi dans l'appareil qui accélère la croissance bactérienne en agitant le bouillon par rotation et utilise des procédés de détection chimique par la mesure du CO<sub>2</sub> libéré suite à la pousse bactérienne par spectrométrie infrarouge. La mesure spectroscopique en infrarouge de la pCO<sub>2</sub> à travers la paroi du flacon, indique la positivité d'une hémoculture et peut être détectée immédiatement en 3 ou 4 heures sinon le flacon est suivi pendant une durée de 5 jours. Ce système est plus rapide et plus sensible que l'hémoculture classique. Des techniques simples, efficaces et reproductibles ont été montées pour le traitement bactériologique des échantillons positifs. Un résultat préliminaire est donné sur la positivité d'un échantillon dont la coloration de Gram est faite et le clinicien en est informé. Le résultat de la coloration de Gram oriente sur le choix des milieux usuels : Gélose au sang de mouton ou de cheval, gélose chocolat et gélose Mac Conkey qui permettent à eux trois seulement la culture de S germes fréquemment rencontrés dans l'hémoculture. Les tests d'hémolyse, de catalase, de coagulase, l'utilisation de facteurs X, V et X+V et les tests présomptifs d'identification des Streptocoques comme la sensibilité à l'optochine, la sensibilité à la bacitracine et les tests de serotypage des Streptocoques du groupe A et B ont été effectués suivant les cas.

La classique galerie API 20E a permis l'identification dans la majorité des cas des Entérobactéries.

Il n'a pas été fait de tests additionnels pour les BGP, les levures, constituant en plus des SNA les contaminants de l'hémoculture. Les cultures sur milieux solides ont permis l'isolement et l'identification finale.

Au terme de notre étude prospective pendant la période de février 2002 à février 2003 nous avons enregistré les résultats suivants. Le nombre total de prélèvement effectué est de 2198, le nombre de flacon négatif est de 1113, le nombre de flacon positif 585 soit 26, 61% des prélèvements. Le nombre total de germes isolés est de 551 soit 98,75% des flacons positifs correspondant à 25,7% de l'ensemble des prélèvements. Les principaux germes sont : *Streptococcus pneumoniae* 21,48% ; *Salmonella Typhi* 15,6% ; *Haemophilus influenzae* 17,14% .

Les antibiogrammes effectués reflètent les sensibilités classiques de ces germes.

Le taux de contaminant observé (7, 28% ) est inférieur à la valeur normale admise.

La maîtrise des techniques qui permettent la pratique de l'hémoculture a fait de cette technique une routine dans le laboratoire de l'HGT aujourd'hui.

## VII. 2. RECOMMANDATIONS :

Vu les résultats de cette étude et l'orientation de HGT en tant que structure d'urgence et soins de la mère et de l'enfant, nous recommandons :

### **Aux autorités de tutelle du laboratoire de HGT et à nos partenaires**

- De faire de l'examen de l'hémoculture une activité de routine de l'Hôpital Gabriel TOURE (HGT).
- D'assurer la formation de l'ensemble des techniciens de l'HGT aux techniques de l'hémoculture.
- D'assurer la formation des biologistes pour des activités de pointes.
- De renforcer la coopération exemplaire avec nos partenaires américains.

# CHAPITRE VIII BIBLIOGRAPHIE

**VIII. BIBLIOGRAPHIE :**

1. **AVRIL J. L. ; DABERNAT. H. ; DENIS F. ; MONTEIL H.** – Bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup> édition. Paris. Ellipses 1992 , p.79 à 80.
2. **AZELE FERRON.** Bactériologie Médicale à l'usage des étudiants en médecine. 10<sup>ème</sup> Edition, 1979, p16-3, 14-4
3. **GORO Diakaria.** Etude de la prévalence des infections nosocomiales d'origine bactérienne dans le service de néphrologie et dans l'unité d'hématologie à l'Hôpital du point G. Thèse Pharmacie Bamako 2002 N° 50
4. **GRE (Tohoury Laurent).** Contribution à l'étude des septicémies a propos de 18 observations colligées dans le service des maladies infectieuses et tropicales du CHU de Treichville (Abidjan), Thèse Médecine 1984 199p N° 502
5. **HENRI LECLERC.** Microbiologie Générale. 2<sup>ème</sup> Edition, 1983. p 199, 202
6. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/pneumoniae.html>
7. <http://www.chez.com/quatemalt/SALMON.html>
8. [http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/sa\\_730\\_ture.htm](http://www.doctissimo.fr/html/sante/analyses/sa_730_ture.htm)
9. <http://www.2m2.Fr/ouvrage>
10. [http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/bacterio-viro/DESLYON/chapitre3/Automate\\_hemocultures.pdf](http://lyon-sud.univ-lyon1.fr/bacterio-viro/DESLYON/chapitre3/Automate_hemocultures.pdf)
11. **Ibrahim Sory YOROTE,** Les méningites purulentes à l'Hôpital national du point G. Thèse : Med ; Bamako 1995- 1996 N° 23
12. **JEAN-LOUIS FAUCHERE.** Techniques de bactériologie clinique. Edition marketing S.A. 1997. p77 à 79. ...

13. **JEAN- LOUP AVRIL**. Dictionnaire pratique de bactériologie clinique. Edition marketing, 1988, p107
14. **JEAN-PIERRE FLANDROIS**. Bactériologie Médicale. Edition Presses Universitaires de Lyon, 1997, p 107, 111, 113, 115, 118, 122, 123, 124, 125, 174, 175, 176, 177, 179, 180, 199
15. **LE MINOR** (Institut Pasteur - Paris). Cours international de microbiologie des aliments. année1988
16. **LEON LE MINOR, MICHEL VERON**. Bactériologie Médicale. 2<sup>ème</sup> Edition Paris, 1989, p 396, 421, 422, 423, 632, 633, 634, 635, 775, 786, 795
17. **MARIANI- KURKDJAN. P. et BINGEN E**. Infections à *Haemophilus* en Pédiatrie. EMC (Elsevier Paris) ; Pédiatrie, 4- 260- A- 10 ; Maladies infectieuses 8- 017F- 15 ; 1998, 6P
18. **Mayrama SIDIBE**. Bilan de six années d'hémocultures au laboratoire de l'Hôpital national du point G. Thèse Pharmacie, Bamako 2000, N° 4
19. **NJIMENTEN**-(Germaine-Laure). Place des bactéries aérobies Gram négatif dans les infections nosocomiales à Paul IGAMBA de port-gentil. GABON de 1990 à 2000
20. **PATRICK R. MURRAY**. Manuel of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> Edition (American Society for Microbiology), Washington DC 20005 p 287
21. **Prof. Dr Eugenia DUCA, Prof. Dr M. DUCA, Conf. Dr. G. FURTUNESCU**. Microbiologie Médicale. Ed. didactique et pédagogique. Bucarest, 1979. p418
22. **RENE CAQUET**. Guide pratique des examens de laboratoire. 6<sup>ème</sup> Edition, Paris 1994
23. **YARRO Fatimata dite N'GO épouse DIARRA**. Septicémies : place des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans le service de médecine interne de l'hôpital national du point G. These Médecine, Bamako 2000, 100p N° :10

# CHAPITRE IX RESUME

**FICHE SIGNALÉTIQUE**

<b>Nom :</b>	SAMAKE
<b>Prénom :</b>	Mariam
<b>Titre de la thèse :</b>	Pratique de l'hémoculture dans le laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel TOURE : Aspects méthodologie.
<b>Année Universitaire :</b>	2003-2004
<b>Ville de soutenance :</b>	Bamako
<b>Pays d'origine :</b>	Mali
<b>Lieu de dépôt :</b>	Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto - Stomatologie
<b>Secteurs d'intérêt :</b>	Bactériologie, Santé publique, Infectiologie, Pédiatrie.

**IX. RESUME :**

Il s'agit d'une approche nouvelle de l'hémoculture par l'utilisation de l'automate le Bactec 9050 et des techniques standards de bactériologie simples mais efficaces.

Après un rappel sur les principaux germes des hémocultures, nous avons obtenu les résultats suivants :

- Nombre total de prélèvements effectués : 2198.
- Nombre de flacons de Bactec positifs : 585 soit 26,61% des prélèvements.
- Nombre de flacons de Bactec négatifs : 1613.
- Nombre de coloration de Gram positifs : 575 soit 98,29% des flacons positifs.
- Nombre de germes après culture et identification : 551. Ce chiffre correspond à 98,75% des flacons positifs et 25,07% de l'ensemble des prélèvements.
- Nombre de contaminants essentiellement les BGP et les SCN : 160 soit 7,28%.
- Nombre de flacons de Bactec positifs ayant « in fine » donné une culture stérile 17.

La fréquence d'isolement des principaux germes a été le suivant :

- 84 *Streptococcus pneumoniae*, soit 21,48% avec des pics en février, mai, juillet et septembre .
- 67 *Haemophilus influenzae type b* soit 17,14% avec une montée des cas pendant la période octobre, novembre, décembre
- 61 *Salmonella Typhi* soit 15,6% dont 25 cas sont retrouvés chez des enfants de 0 à 3 ans. Il s'agit d'une situation inhabituelle.
- 31 *Staphylococcus aureus*, soit 7,93%
- 19 *Escherichia coli* soit 4,86%
- La majorité des SCN isolés par hémoculture sont des contaminants, ce qui pose parfois des problèmes difficiles d'interprétation.

**MOTS CLES** : Hémoculture, Pédiatrie, Bactec, Bactériémie, Asepsie.

**CHAPITRE X**  
**ANNEXES**

### Composition du bouillon BACTEC 9050

Avant analyse, les flacons de culture BACTEC PEDS PLUS/F contiennent les réactifs suivants:

#### Liste des composants

(les pourcentages correspondent au poids par rapport au volume)

Eau traitée	40 ml
Bouillon digéré de soja-caseine	2,75 %
Extrait de levure	0,25 %
Digestion de tissu animal	0,10 %
Pyruvate de sodium	0,10 %
Dextrose	0,06 %
Sucrose	0,08 %
Hémine	0,0005 %
Méladione	0,00005 %
Polyanéthol Sulfonate de Sodium (PSS)	0,020 %
Chlorhydrate de pyridoxal (vitamine B6)	0,001 %
Résine absorbante non ionique	10,0 %
Résine échangeuse de cations	0,6 %

### Autres flaconnages

#### - **BD Bactec™ PLUS/F**

Ces milieux de culture contiennent des résines qui neutralisent une grande variété d'antibiotiques et permettent d'améliorer la mise en évidence des germes chez les patients sous antibiothérapie.

#### **BD Bactec™ LYTIC/10 Anaerobic/F**

Ce milieu contient un agent lytique qui permet de détecter plus rapidement des organismes en partie phagocytés par les leucocytes.

#### **BD Bactec™ PEDS PLUS/F**

Ce milieu conçu pour les échantillons de faible volume permet d'optimiser la détection des germes pathogènes courant chez les enfants.

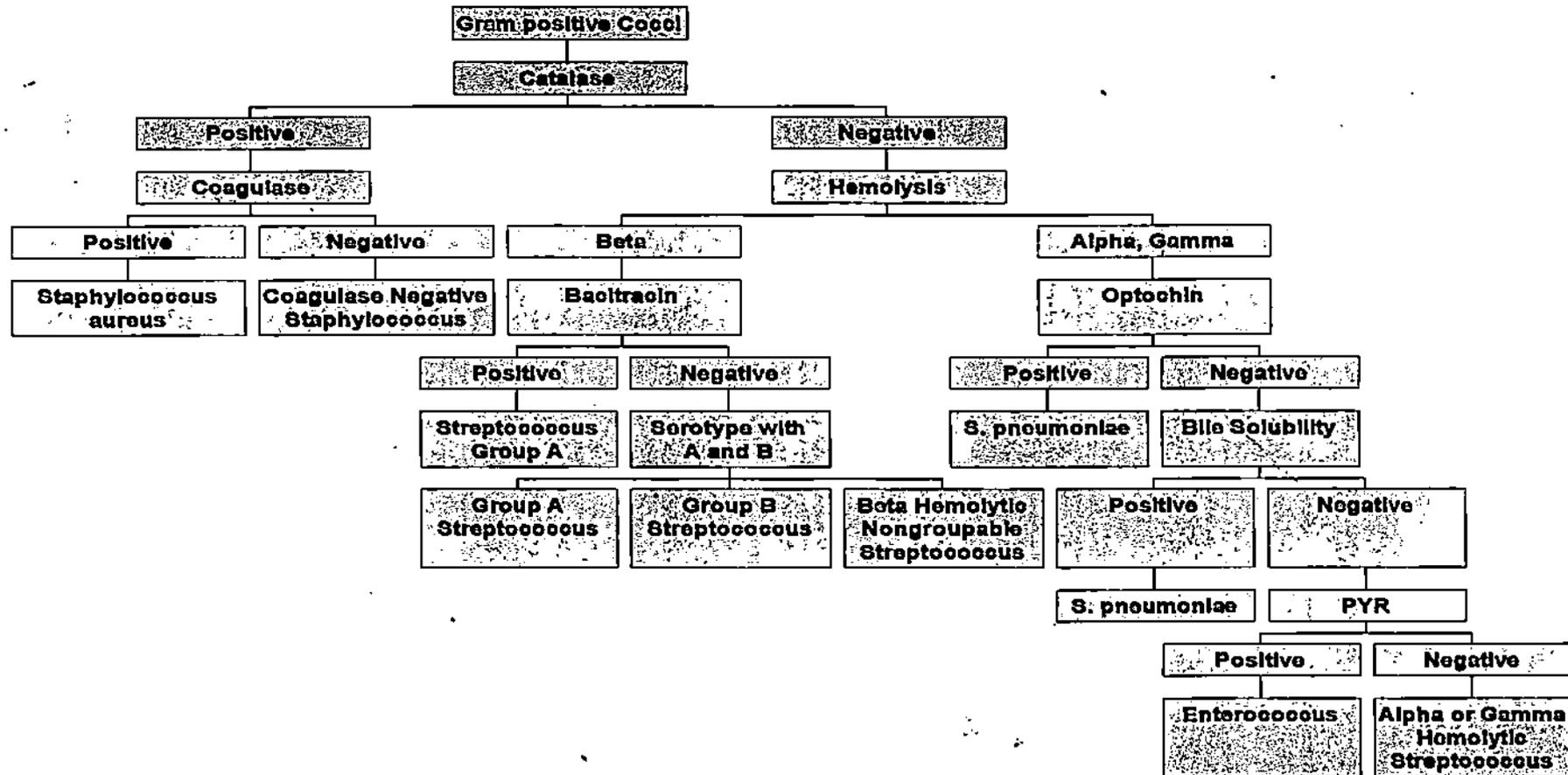
#### **BD Bactec™ MYCOSIS-IC/F**

Ce milieu fongique facilite la mise en évidence de levures qui peuvent être masquées par la prolifération bactérienne dans la culture.

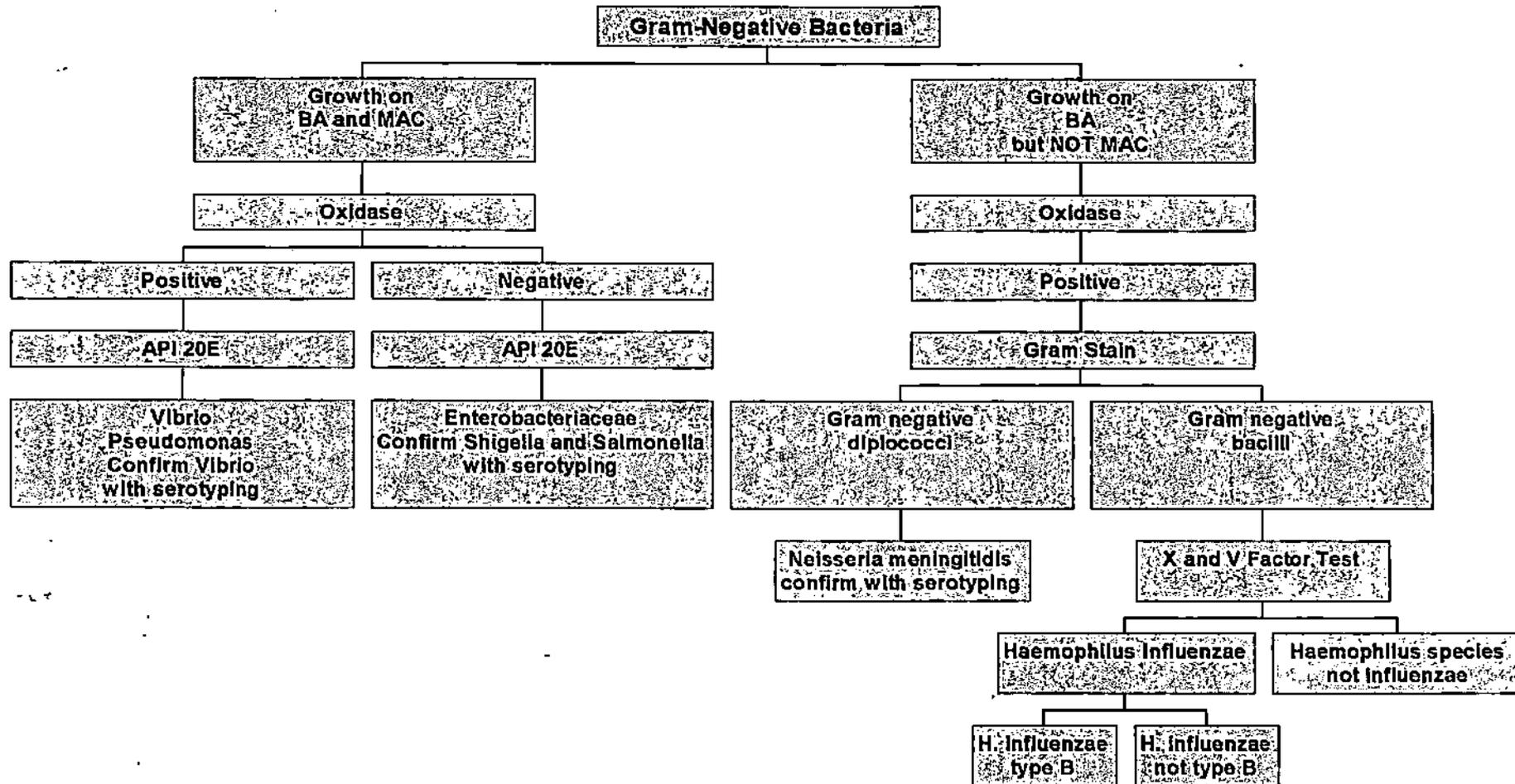
**BD Bactec™ MYCO/ FLYTIC**

Ce milieu 7H9 supplémenté a été spécialement développé pour la détection des mycobactéries, levures et champignons dans le sang. Il contient un agent lytique qui permet de détecter plus rapidement des organismes en partie phagocytés.

# Evaluation of Gram positive cocci Growing in Culture



# Evaluation of Gram negative bacteria Growing in Culture



## FICHE DE TRAVAIL – MICROBIOLOGIE

Version 4/10/02

NOM DU PATIENT \_\_\_\_\_

No DOSSIER \_\_\_\_\_ DATE RECEP \_\_\_\_\_

No BACTEC \_\_\_\_\_ DATE POSITIF \_\_\_\_\_

NATURE DU PRELEVEMENT: SANG - LCR - AUTRE \_\_\_\_\_

### RESULTATS

#### COLORATION DE GRAM:

CGPgr-CGPpr- CGPch- BGP- BGN- CoccoBGN- DCGN-Levures

1<sup>ST</sup> PRELIM DATE/ TECH \_\_\_\_\_

#### CROISSANCE SUR GELOSE :

AU SANG - MACCONKEY - PAS DE CROISSANCE

#### ASPECT DES COLONIES

HEMOLYSE : ALPHA - BETA - ABSENCE D'HEMOLYSE

APPARENCE : SEC- MUQUEUX - AUTRE \_\_\_\_\_

#### TESTS D'AGGLUTINATION

N. MENINGITIDIS POS NEG GROUP \_\_\_\_\_

SALMONELLA POS NEG TYPE \_\_\_\_\_

SHIGELLA POS NEG TYPE \_\_\_\_\_

H. INFLUENZAE POS NEG TYPE \_\_\_\_\_

BETA STREP TYPE POS NEG TYPE \_\_\_\_\_

AUTRE \_\_\_\_\_ POS NEG TYPE \_\_\_\_\_

#### TEST BIOCHIMIQUES

OXIDASE POS NEG

CATALASE POS NEG

COAGULASE POS NEG

PYR TEST POS NEG

SOLUBILITE PAR LA BILE POS NEG

OPTOCHIN (P) DISQUE S R

BACITRACIN (A) DISQUE S R

HAEMOPHILUS ID: X V XV

API 20E/ CODE# \_\_\_\_\_

2<sup>ND</sup> PRELIM DATE/ TECH \_\_\_\_\_

#### IDENTIFICATION FINALE #1/ STOCK #

ANTIBIOTIQUES	ZONE	RESULTAT		
AMPICILLINE	_____	S	I	R
PENICILLINE	_____	S	I	R
OXACILLINE	_____	S	I	R
ERYTHROMYCIN	_____	S	I	R
CEFTRIAZONE	_____	S	I	R
CHLORAMPHENICOL	_____	S	I	R
GENTAMICIN	_____	S	I	R
COTRIMOXAZOLE	_____	S	I	R
CIPROFLOXACIN	_____	S	I	R

## SERMENT DE GALIEN

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

. D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes  
de mon art et 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 de 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.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis  
fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes  
confrères si j'y manque.

Je le jure.