

République du Mali  
Un Peuple-Un But-Une Foi

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE

UNIVERSITÉ DE BAMAKO

Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie

ANNEE : 2009-2010

Thèse N°.....

---

**Bilan de sept (7) ans d'hémoculture  
en milieu hospitalier pédiatrique  
de Bamako**

---

Thèse présentée et soutenue publiquement le 10/12/2009

Faculté de Médecine de Médecine et D'Odonto-Stomatologie

Par **Mariam Sékou Koné**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine (Diplôme d'Etat)

**JURY :**

**Président du jury:**

Pr Moussa HARAMA

**Membres du jury:**

Pr Soukalo Daou

Dr Broulaye Traoré

**Co-directeur de thèse :**

Dr Souleymane Diallo

**Directeur de thèse**

Pr Flabou Bougoudogo

## 1. INTRODUCTION et OBJECTIFS

### - INTRODUCTION

L'hémoculture est une technique de laboratoire dont le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence de microorganismes (bactéries et levures) dans le sang et d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques selon les cas. [1]

L'hémoculture est un élément capital du diagnostic, du pronostic et du traitement de nombreuses infections sévères s'accompagnant de passage bactérien dans le sang.

C'est un moyen simple et efficace qui a pour objectif de démontrer dans les meilleurs délais la présence de micro-organisme dans le sang (bactéries, champignons) leur identification et leur sensibilité aux antibiotiques.

L'importance de l'intérêt diagnostique et thérapeutique devant la diversité des états infectieux, explique sa prescription presque systématique en milieu hospitalier. [2]

L'hémoculture représente le moyen le plus sûr de reconnaître le germe responsable d'une septicémie, mais elle exige un délai souvent incompatible avec l'urgence de la situation. Les bactéries responsables de septicémie ou de bactériémie sont très variées, et il faut parfois faire preuve d'ingéniosité pour les isoler et les identifier. [3]

L'hémoculture est un examen très performant. Il est sensible (on détecte, en théorie une seule bactérie viable dans l'échantillon examiné). [1]

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. [4]

Au cours des septicémies, le nombre de bactéries 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. [5]

L'hémoculture, examen capital en pathologie infectieuse, n'est pas toujours praticable dans bon nombre d'hôpitaux africains et le clinicien est souvent contraint de suspecter la bactérie causale afin de définir une attitude thérapeutique. En effet, rares sont les signes de certitude et le médecin raisonne plutôt par arguments de fréquence. [1, 2]

Mais il faut se souvenir que 15% environ des hémocultures positives sont des hémocultures qui ont été contaminées lors du prélèvement. [1]

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. [1]

Les milieux de cultures utilisés sont liquides, semi-gélosés 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.). [1]

Divers flaconnages sous pression réduite facilitent et rendent plus sûre la pratique de l'hémoculture c'est le cas du flacon de BACTEC®.

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 ( $\text{CO}_2$ , ion  $\text{H}^+$ , 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. [2]

Dans le but d'un diagnostic rapide pour une meilleure prise en charge des états bactériémiques, la collaboration étroite entre le clinicien et le microbiologiste s'avère donc nécessaire.

C'est la raison pour la quelle nous nous sommes donc intéressés à l'apport du laboratoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE à Bamako.

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 17 ans hospitalisés ou traités en ambulatoire dans les Services de Pédiatrie du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE.

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 au Centre Hospitalier universitaire Gabriel TOURE.

## **- OBJECTIFS**

Nos objectifs sont les suivants :

### **. OBJECTIF GENERAL :**

Etudier la fréquence d'isolement dans les hémocultures des bactéries à l'origine des infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique dans le Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE.

### **. OBJECTIFS SPECIFIQUES :**

1. Analyser les conditions de réalisation des hémocultures et la conservation des souches bactériennes.
2. Déterminer l'aspect des bactéries par la coloration de Gram à partir des hémocultures.
3. Déterminer la fréquence d'isolement des bactéries dans les hémocultures.
4. Préciser le profil de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées.
5. Décrire l'évolution de la fréquence d'isolement des bactéries selon les années.

## 2. GENERALITES

### 2.1. RAPPELS CLINIQUES

- Sang et bactérie : Le sang est un liquide stérile. Cependant, à partir de sites ou de foyers infectieux, différents germes tels que les bactéries, les champignons peuvent être relargués dans le sang.

La présence de bactéries dans le sang ou bactériémie, peut être accompagnée de manifestations cliniques d'une infection grave, notamment de frissons, de fièvre, de signes de toxicité et d'hypotension.

- Physiopathologie

La présence de bactéries dans le système circulatoire déclenche un ensemble de mécanismes dont l'effet sera l'apparition de divers signes cliniques.

L'événement initiateur est la libération par l'agent causal :

- . de débris de paroi : peptidoglycane, acide teïchoïque...
- . d'endotoxines produites par les bacilles à Gram négatif

Ce sont des lipopolysaccharides dont le noyau lipidique central (lipide A)

est presque toujours identique d'une bactérie à une autre et constitue la partie toxique de ces molécules.

C'est pourquoi il a été envisagé la possibilité que des anticorps réagissant de façon croisée avec le noyau de l'endotoxine puissent conférer une protection vis à vis d'une grande variété de souches bactériennes.

- . d'exotoxines.

La cible est à la fois :

- humorale par l'activation du complément avec la libération de C3a

et de C5a, et du facteur XII (facteur contact) ;

- cellulaire par l'activation des monocytes, macrophages et libération de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL1, IL6, IL8...)

Les conséquences biologiques sont :

- l'activation de la coagulation et donc la survenue d'une coagulation Intra-vasculaire disséminée (C.I.V.D).

- l'activation des neutrophiles qui adhèrent à la fois entre eux et aux endothéliums vasculaires. Ce processus est considéré comme responsable du syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte.

- la libération de dérivés de l'acide arachidonique, de radicaux libres, de l'oxygène et d'enzymes lysosomiaux qui suscitent une cytotoxicité au niveau des cellules endothéliales avec fuite capillaire et une vasodilatation. La conséquence clinique est une hypovolémie.

- les multiples médiateurs apparus sous l'action de l'endotoxine concourent à la survenue de lésions endothéliales qui vont ensuite provoquer la libération des mêmes médiateurs. L'intensité et la localisation préférentielle de ces réactions cellulaires à tel ou tel organe conditionnent le stade clinique, la symptomatologie et la réversibilité des lésions. (Figure 1)

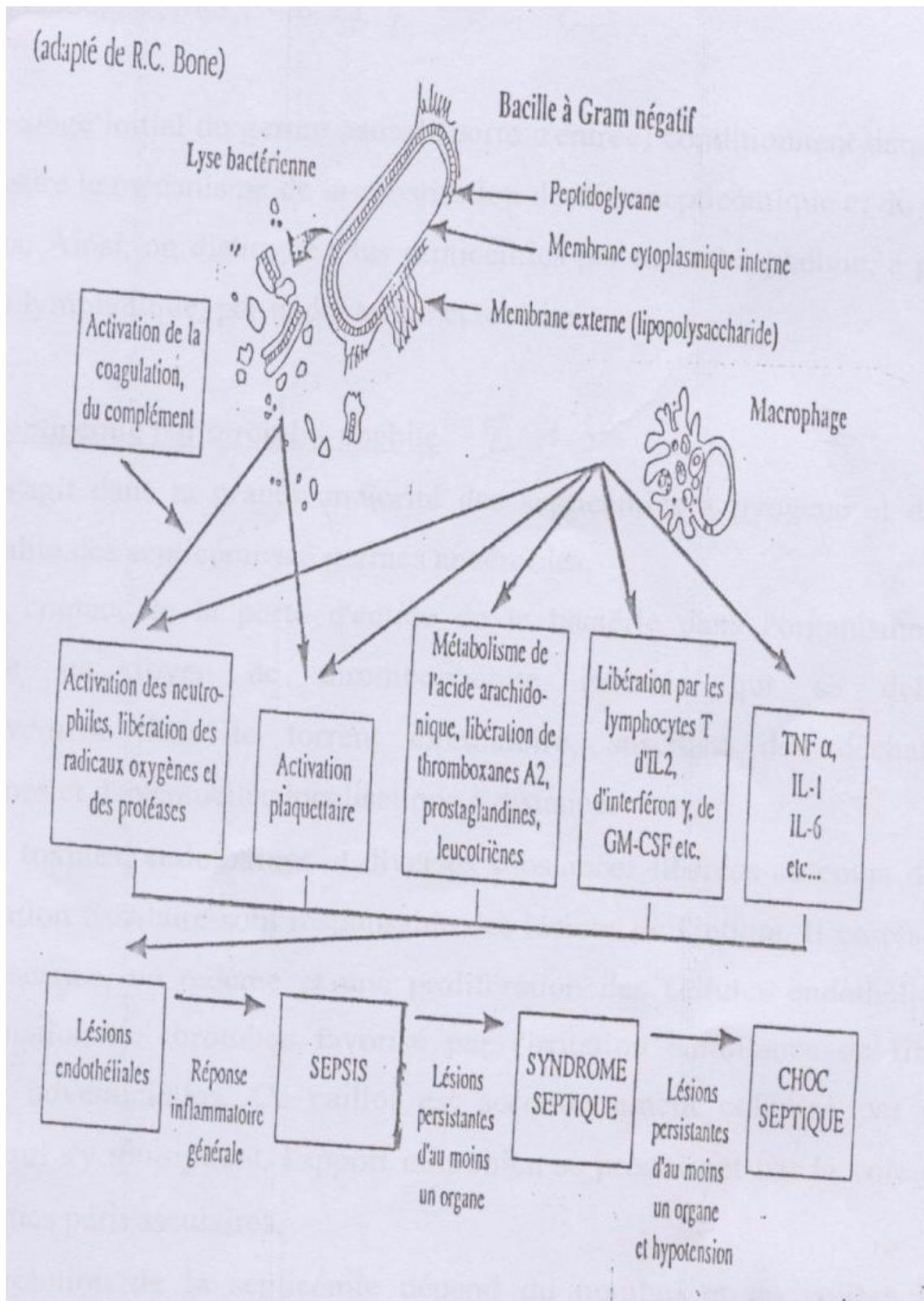


Figure 1 : Physiopathologie de l'état infectieux. [6]

La porte d'entrée du germe causal conditionne, dans une large mesure, le

mécanisme de la constitution de l'état septicémique et du choc infectieux et suivant donc le siège initial du germe causal plusieurs types de septicémies sont à noter :

- septicémie thrombose-phlogistique ;
- septicémie à point de départ lymphatique ;
- septicémie par endocardite et artérite.

Devant le problème médical que posent les états septicémiques, l'identification de l'agent causal et la recherche du foyer est une étape essentielle dans la prise en charge des états septicémiques. L'exploration diagnostique en laboratoire, devra être complétée par la recherche des sensibilités aux substances antibactériennes, et la surveillance de l'efficacité thérapeutique puisque la vraie maladie n'est pas la présence de bactéries dans le sang mais l'existence d'un foyer qu'il faudra stériliser pour guérir le sujet malade. [7, 8, 9]

## **2.2. HEMOCULTURE**

**2.2.1. Définition :** Le terme « hémoculture » peut se définir de deux manières selon le contexte d'utilisation. En règle générale, l'hémoculture est la technique microbiologique qui consiste en ensemencement d'un milieu de culture avec une petite quantité de sang prélevé sur un sujet afin de déterminer les micro-organismes qui l'affectent. [10]

Une hémoculture, en langage usuel, correspond à une série de plusieurs (minimum 3) flacons issus d'une même ponction veineuse. [9]

### **2.2.2. Historique :**

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

En 1850, **DAVAINE**, 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, **DAVAINE** 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 ». A cet effet, il prélève du sang sur les animaux malades du charbon encore vivants et aussi sur des cadavres. Ce sang est « déposé dans les petits vases en verre à ouverture élargie et placés 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 avec la notion d'hémoculture.

Il faut cependant attendre 1863 pour que **DAVAINE** affirme avec **PASTEUR** que les éléments microscopiques qu'ils ont nommés « bactéries » étaient responsables du charbon. Et dès 1865, le rôle que joue, la « culture du sang », apparaît dans les travaux de **Louis PASTEUR** (1822 – 1895). Il s'agit d'une part, de ses recherches sur la bactérie charbonneuse et d'autre part sur la « théorie des germes et ses 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. La recherche d'un « bon milieu de culture » pour faire

« se reproduire » le micro- organisme découvert dans le sang est donc un élément capital.

Mais, très tôt, un autre problème sera soulevé par **PASTEUR**, celui des souillures extérieures, en particulier à partir des germes atmosphériques. La nécessité de travailler de façon aseptique constituera alors l'une des principales difficultés techniques de l'hémoculture. **PASTEUR** constate par ailleurs que certains germes du sang de l'animal charbonneux ne poussent que lorsqu'il fait le vide dans ses tubes de culture avant de les fermer à la lampe. Ainsi naissait la notion d'hémoculture anaérobie.

Notons que les premiers cas de maladies humaines où la culture du sang a été employée semblent être ceux de septicémies puerpérales.

Le 11 mars 1879, **PASTEUR**, à l'Académie de Médecine de Paris, rapporte des cas de culture en clinique humaine. La technique utilisée pour le prélèvement est une « piqûre à l'index de la main gauche, qui avait été préalablement convenablement lavé et essuyé avec un linge flambé ». La nature du milieu de culture n'est évidemment pas négligeable. **PASTEUR** évoqua alors « la nécessité d'un milieu de culture approprié pour chaque germe ». Malgré toutes ces précautions, bon nombre d'hémocultures restaient négatives, ce qui conduit **PASTEUR** à étudier les principaux facteurs de stérilités :

- les germes peuvent être rapidement détruits par le sang d'où leur disparition rapide, même lorsque le prélèvement contient des germes ;
- le choix du milieu de culture est primordial ;
- la destruction de certains germes par l'oxygène de l'air impose de cultiver le sang en milieu anaérobie en plus du milieu aérobie ;
- la quantité de sang prélevée par piqûre de la pulpe de l'index est insuffisante, les germes peuvent ne pas se trouver qu'en très petit nombre dans la circulation sanguine.

Les principes de l'hémoculture se trouvaient ainsi posés par **PASTEUR** qui avait déjà pressenti ces difficultés.

Vers 1880, on voit donc se multiplier les cultures bactériologiques du sang au cours de maladies humaines variées. En France, les disciples de **PASTEUR** sont de plus en plus nombreux (même si les résistances sont nombreuses également) et persuadés du rôle du sang dans le transport de germes d'un point à un autre de l'organisme.

Parmi eux, retenons **Jacques DOLERIS**, obstétricien hospitalier qui, faisant des travaux sur la fièvre puerpérale décrit une des premières techniques de l'hémoculture. Le prélèvement est pratiqué de façon aseptique à la pulpe du doigt et, si possible en plusieurs endroits du corps (lobule de l'oreille, orteil médian du pied, poignet droit etc...). Les ballons de culture possèdent un col effilé et un bouchon de verre prolongé par un tube muni d'ouate stérile. On ensemence une goutte de sang et le ballon est porté à l'étuve à 36 °C. Et s'il reste limpide après 36 heures, c'est qu'aucun organisme ne s'y est développé soit parce que le liquide ensemencé ne contenait pas de germe, soit que le microbe en expérience n'a pas trouvé dans le ballon un milieu approprié à son développement. La multiplicité des cultures est recommandée afin d'éliminer les causes d'erreur.

Malgré les difficultés rencontrées, **DOLERIS** semble bien être le premier à avoir systématisé la pratique de l'hémoculture en milieu hospitalier. De plus, **DOLERIS** souligne que la culture de sang ne peut être positive à tout moment de la maladie, qu'une culture négative peut se voir en pleine évolution, et il faut alors attendre une poussée thermique ou des frissons pour que le germe soit cultivé. Notons qu'à cette époque les hémocultures donnaient des poussées microbiennes bien souvent à la phase terminale de la maladie que durant la phase organique ou post-mortem.

**ROSEMBACH**, en 1884, est l'un des premiers à avoir obtenu une hémoculture positive au cours de l'évolution de la maladie. [11]

### **2.2.3. Objectifs et paramètres de l'hémoculture**

### **2.2.3.1. Objectifs :**

L'hémoculture aura deux objectifs : un objectif de diagnostic et un objectif thérapeutique.

**2.2.3.1.1. Objectif de diagnostic :** toute fièvre non expliquée doit faire chercher un état septicémique ; que le tableau soit évocateur ou que la fièvre soit isolée. Une hypothermie majeure ; avec une température à 36,5° C, doit faire rechercher un état septicémique.

**2.2.3.1.2. Objectif thérapeutique :** l'isolement et l'identification de la bactérie cliniquement significative, seront complétés par une étude de sa sensibilité à diverses substances antibactériennes pour un ajustement de l'antibiothérapie probabiliste préalablement instaurée par le clinicien, après ou avant le prélèvement sanguin, en fonction du tableau clinique du patient.

### **2.2.3.2. Paramètres :**

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 :

#### **2.2.3.2.1. Paramètres pré-analytiques :**

Ils sont essentiels pour rendre des résultats de qualité

#### **Prélèvement sanguin**

- Moment du prélèvement: le moment du prélèvement est capital. Pour une bactériémie discontinue, la recommandation internationale est en faveur du moment des frissons ou un clocher thermique pouvant correspondre à une décharge bactérienne. Au cours des états fébriles prolongés et inexpliqués, le moment du prélèvement importe peu.

Le prélèvement est effectué avant toute antibiothérapie dans la mesure du possible. Dans le cas contraire, une fenêtre thérapeutique est opérée pour effectuer les prélèvements.

Les prélèvements sont effectués à un intervalle d'environ une heure pour 2 à 3 hémocultures.

- Volume sanguin: le nombre de bactéries par ml de sang étant en général faible, il importe de prélever une quantité suffisante de sang.

. Pour l'adulte, 10 ml par ponction veineuse périphérique. La veine du pli du coude est la plus indiquée.

. Chez l'enfant ou le nouveau-né, le volume de sang à prélever doit être déterminé par le médecin traitant. Pour le nouveau-né, il est souvent difficile d'obtenir plus d'1 à 2 ml de sang. Chez l'enfant 2 à 5 ml de sang peuvent suffire.

- Technique de prélèvement: le prélèvement doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Il constitue une étape essentielle pour diminuer les contaminations car il faut rappeler que 15 % environ des hémocultures positives sont contaminées lors du prélèvement ; la flore cutanée et environnementale est rendue responsable des contaminations.

L'interprétation des résultats devient alors problématique.

- Mode de prélèvement

Les modes de prélèvement sont variables.

. Des systèmes de prélèvement proposés dans le commerce sont largement utilisés de nos jours. Le système est constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille permettant l'une la ponction veineuse, l'autre l'inoculation des flacons.

. D'autres utilisateurs emploient simplement une seringue stérile montée avec laquelle ils ensemencent les flacons au lit du malade.

. L'utilisation d'un Veinotube par certains centres peut être préjudiciable dans la mesure où elle retarde l'ensemencement du sang et augmente les risques de contamination par une manipulation supplémentaire nécessaire. (Figure 2)

Foyer microbien

Réceptacle des

Bactéries

Peau et

Environnement

Flore bactérienne

bactérienne

bactérienne

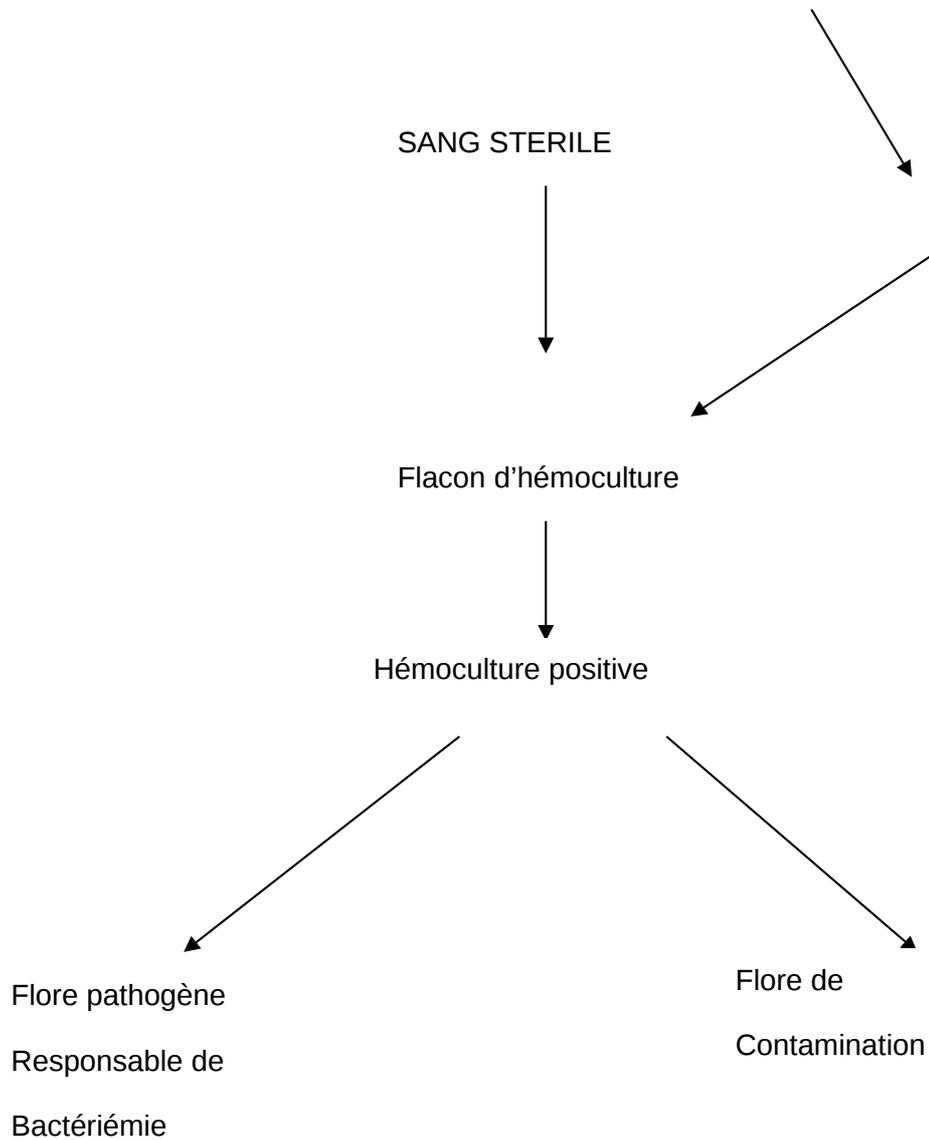


Figure 2 : Agents bactériens attendus

- Désinfection cutanée

Si les recommandations de l'O.M.S sont précises en matière de ponction veineuse, un accent particulier est mis sur l'antiseptie pour l'hémoculture.

L'antiseptie de choix est la teinture d'iode qui est bactéricide.

Pour des sujets présentant une allergie connue à l'iode, l'utilisation du chlorehexidine alcoolique est recommandée. Le choix peut être aussi porté sur la Bétadine dermique® ou à défaut l'alcool iodé.

La peau de la zone de prélèvement ainsi que les doigts du préleveur doivent recevoir deux applications d'antiseptique séparées de deux à trois minutes. [9, 12, 8]

#### **2.2.3.2.2. Paramètres analytiques :**

Différents facteurs influent sur la positivité d'une hémoculture.

##### **2.2.3.2.2.1. Faible densité bactérienne :**

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

Les répétitions des cultures permettent de :

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

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

- Pour un prélèvement de 20 ml à 40 ml : + 10% de positivité
- Pour un prélèvement de 40 ml à 60 ml : + 19% de positivité

Une augmentation de volume entraîne une augmentation de la sensibilité.

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

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

- Les corps bactériens sous forme "L" : correspondent à des bactéries déficientes nutritionnelles.

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

### **2.2.3.2.2.3. Milieux d'hémoculture**

De très nombreux milieux présentés en flacon sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc, sont proposés par les fabricants.

Pour favoriser la multiplication des corps bactériens en faible densité, captés lors du prélèvement il est nécessaire de procéder à une primo- culture.

#### **a. Choix du bouillon**

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

Plusieurs bouillons sont utilisés :

- bouillon cœur- cervelle ;
- bouillon trypticase –soja ;
- milieu au thioglycolate pour les anaérobies.

Un accent est mis sur la quantité de bouillon à ensemer. Dans l'idéal, l'O.M.S recommande de mélanger le sang avec dix fois son volume de bouillon soit pour 5 ml de sang un équivalent de 50 ml de bouillon.

#### **• Facteurs de croissance**

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

Quel que soit le milieu, plusieurs additifs sont proposés.

- Atmosphère

La plupart des milieux commercialisés ont une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et en Azote (N<sub>2</sub>). L'enrichissement en oxygène pour les germes aérobies se fait au moment du prélèvement.

- Anticoagulants

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

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

L'anticoagulant habituellement utilisé est le S.P.S : Polyanéthol Sulfonate de Sodium. D'autres anticoagulants tels que le citrate, l'héparine sont aussi utilisés.

- Saccharose

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

- Molécules à groupement « thiol » ou « pyridoxal »

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

- Facteurs de croissance

L'hémine, la vitamine K<sub>3</sub>, favorisent le développement des bactéries exigeantes et des anaérobies.

- Inhibiteurs d'antibactériens

La pénicillinase inactive les β-lactamines en occurrence les pénicillines.

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

Si divers milieux sont proposés, leurs compositions sont le plus souvent l'objet de protection industrielle.

## **b. Flacons d'hémoculture**

- Constitution des flacons

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

- Typologie des flacons

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

. Flacons aérobies

Grâce à leur atmosphère enrichie en oxygène, ils favorisent la croissance et la multiplication des bactéries aérobies strictes rencontrées en clinique. Le milieu de culture est mono ou bi phasique.

. Flacons anaérobies

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

. Flacons spéciaux

D'autres types de flacons sont proposés en fonction de la clinique du patient par les fabricants. [9, 12, 8]

#### **2.2.4. Etude bactériologique:**

Dès réception au laboratoire les flacons doivent être incubés à 35-37°C et inspectés régulièrement.

##### **2.2.4.1. Détection manuelle**

α. Inspection journalière

L'inspection macroscopique journalière des flacons par mirage, vise à déceler des signes d'une croissance microbienne. Une culture stérile montre en général un dépôt d'hématies recouvert d'un bouillon transparent jaune pâle. La croissance est attestée par :

- un dépôt flocculeux au-dessus de la couche d'hématies ;
- un trouble uniforme ou situé juste sous la surface ;

- une hémolyse ;
- une coagulation du bouillon ;
- une pellicule de surface ;
- la production de gaz carbonique ;
- la présence de grains blancs à la surface ou à l'intérieur de la couche de sang.

La durée d'observation varie de 10 jours à un mois surtout pour les bactéries à culture lente.

Toute positivité d'un flacon entraîne un examen microscopique.

#### β. Examen microscopique

Devant une croissance visible, le flacon est ouvert aseptiquement et une petite quantité de bouillon est prélevée à l'aide d'une anse stérile ou d'une pipette Pasteur. Un frottis coloré par la méthode de Gram permet de repérer la présence de germes. Le prélèvement du bouillon peut être exécuté à l'aide d'une seringue montée après désinfection de l'opercule de caoutchouc.

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

#### c. Repiquage et isolement - Identification

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

L'identification du germe se fera selon l'aspect des colonies sur des différents milieux de repiquage. Dans des conditions où les risques de souillure sont élevés, il est possible de procéder à des subcultures « à l'aveugle ».

Pour toute détection manuelle, plusieurs systèmes sont aussi utilisés.

- Systèmes Signal : détection de la surpression dans le flacon liée à la croissance bactérienne par passage du bouillon de culture à travers une aiguille fixée dans la partie supérieure du flacon.

- Systèmes Isolator : système de « lyse-centrifugation » permettant de recueillir et de concentrer les micro-organismes à partir du ganglion et des leucocytes. Ce système est performant pour les mycobactéries, les levures à croissance difficile et les champignons filamenteux, les bactéries exigeantes.

#### **2.2.4.2. Détection automatisée**

Divers automates (BACTEC® 9050, Bio Argos, Bact Alert, Organon Technica) permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives par la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance bactérienne.

Ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats.

Leur seul inconvénient est le coût onéreux.

Différents systèmes plus sophistiqués sont proposés mais ils n'ont pas fait la preuve évidente d'une supériorité pour la détection de positivité des hémocultures. [8, 9, 12, 1]

#### **- Résultats - Interprétation :**

Les résultats d'une hémoculture peuvent revêtir deux aspects :

- Résultats normaux

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

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

- Résultats pathologiques

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

Schématiquement, on peut distinguer trois types de résultats :

- Premier cas

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

Cependant dans certains cas, en fonction de la porte d'entrée, les hémocultures positives peuvent être polymicrobiennes chez un même sujet.

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

- Deuxième cas

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

. S'il s'agit d'une bactérie pathogène spécifique (B.P.S.), elle peut être considérée comme responsable.

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

. La bactérie est fréquemment responsable de contamination. Sa responsabilité ne sera admise que si le même germe est découvert au niveau du foyer infectieux ou de la porte d'entrée.

- Troisième cas

Toutes les hémocultures réalisées sont négatives. Un tel résultat est un bon argument pour éliminer une septicémie, à condition bien sûr que les conditions de réalisation aient été scrupuleusement observées.

Cependant, plusieurs hémocultures peuvent être négatives malgré une clinique évocatrice. Plusieurs causes d'échec peuvent expliquer l'obtention de faux négatifs :

- . prélèvement effectué au mauvais moment ou tardivement,
- . prélèvement fait sous antibiothérapie,
- . quantité insuffisante de sangensemencé,
- . milieux ou conditions de cultures inappropriées,
- . temps d'observation trop court,
- . mauvaise observation des flacons,
- . mauvais choix des conditions de subcultures.

Pratiquée avant toute antibiothérapie, et suivant un protocole rigoureux devant maintenir continuellement une asepsie totale, l'hémoculture constitue l'élément capital du diagnostic d'une bactériémie physiologique ou pathologique. Les résultats de l'hémoculture en cas de positivité doivent cependant être complétés par l'étude de l'activité des substances antibactériennes en vue d'une antibiothérapie en rapport avec la clinique du patient. La confrontation entre les résultats en laboratoire et la clinique s'avère donc indispensable à toutes les étapes du diagnostic. [1, 13]

### **2.2.5. PRINCIPAUX GERMES DES HEMOCULTURES**

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.

### **2.2.5.1. Cocci à Gram Positif :**

#### **2.2.5.1.1. Genre *Streptococcus* :**

Les Streptocoques appartenant au genre *Streptococcus* sont des Cocci 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 éco-bactériologique 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. [14]

La famille des streptococcoceae se divise en trois genres :

- Le genre *Streptococcus* formé par les entérocoques antérieurement classés comme streptocoques du groupe D, ainsi par des espèces nouvellement décrites.
- Le genre *Lactococcus* (streptocoques lactiques).

Les genres *Streptococcus* et *Enterococcus* rassemblent des espèces bactériennes qui ont en commun un certain nombre de caractères. [16]

- ***Streptococcus pneumoniae* :**

*Streptococcus pneumoniae* communément appelé le pneumocoque, est une bactérie commensale des voies aériennes supérieures qui colonise le rhinopharynx dès les premiers jours de la vie, de sorte que près de 50% des enfants sont atteints à l'âge de deux ans. [15]

- **Streptocoques Béta hémolytiques :**

- ***Streptococcus pyogènes*** (ou Streptocoques du groupe A) :

Cocci à Gram positif associés en chaînettes, *Streptococcus pyogènes* 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 fascistes 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.

- ***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 est sensible aux pénicillines.

#### 2.2.5.1.2. Genre *Enterococcus* :

Ce sont des Cocci à Gram positif, sphérique ou ovoïde, disposés en paire pour former des diplocoques pouvant se présenter sous forme de chaînettes parfois longues, ils ne se sporulent pas. [16]

#### **2.2.5.1.3. Genre *Staphylococcus* :**

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880.

Les espèces appartenant au genre *Staphylococcus* possèdent une catalase et se développent en aérobiose. [16]

- ***Staphylococcus aureus* :**

*Staphylococcus aureus* se présente sous forme de Cocci arrondis, immobiles, soit isolés, soit regroupés en courtes chaînettes ou en amas dans le pus où les éléments sont tantôt libres tantôt phagocytés. [17]

Comme les autres Staphylocoques, *Staphylococcus aureus* est présent dans l'environnement (air, sol, aliments, mobilier, et matériels). Vit fréquemment à l'état commensal sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux. [18]

- **autres Staphylocoques :**

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

#### **2.2.5.2. Cocci à Gram négatif :**

##### **2.2.5.2.1. Généralité sur les Neisseriaceae**

*Neisseria meningitidis* ou méningocoque est un diplocoque à Gram négatif intracellulaire en majorité en forme de grain de café mesurant 0,8 à 1µm de diamètre, Il est responsable de la méningite cérébro-spinale épidémique.

Le méningocoque appartient à la famille des Neisseriaceae qui comprend actuellement deux genres d'intérêt médical :

- Le genre *Neisseria*
- Le genre *kingella* [19]

### 2.2.5.3. Bacilles à Gram Négatif

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

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

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

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

de la bactérie. La membrane externe est reliée au peptidoglycane par la lipoprotéine de Braun.

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

La membrane plasmique est semblable à la membrane externe (excepté le LPS). Elle possède des protéines poreuses aboutissant dans l'espace périplasmique (synthèse des protéines). La membrane plasmique contient de nombreux autres complexes protéiques d'une importance vitale pour la bactérie (comme l'ATP synthase) qui ont des rôles prépondérants dans le métabolisme bactérien. [19]

#### **2.2.5.3.1. Enterobacteriaceae :**

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

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

- s'ils sont mobiles, sont péritriches (cils disposés tout autour du corps bactérien ;
- poussent sur milieux ordinaires ;
- poussent en aérobiose et en anaérobiose ;
- réduisent les nitrates en nitrites ;

- ont une réaction d'oxydase négative ;
- utilisent le glucose par voie fermentative.

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

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

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

Ce sont :

- *Escherichia*, *Shigella*.
- *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*.
- *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.
- *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (groupe KES « VP + » ), *Hafnia*.
- *Yersinia*, *Edwardsiella*.

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

Ce sont :

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

L'identification des Entérobactéries se fait d'abord par l'étude des caractères biochimiques. Mais au sein d'une même espèce, la variabilité de certains

caractères permet de différencier les souches entre elles et de déterminer des biotypes.

L'étude des différents antigènes, qui intervient après celle des caractères biochimiques, permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce ou à un même genre. La détermination des sérotypes a un grand intérêt épidémiologique pour certaines Entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*. [20]

#### 2.2.5.3.2. Autres Bacilles Gram Négatifs

- ***Haemophilus influenzae* type b :**

C'est un bacille à Gram négatif immobile de petite taille (0,5 – 2,5), agent supposé de la grippe (*influenza*) reçoit le nom générique d'*Haemophilus* car il exige pour sa croissance des milieux enrichis au sang et une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> « *Haemophilus influenzae* type b » est un hôte exclusif des muqueuses de l'homme principalement au niveau des voies aériennes supérieures »[22]

- ***Pseudomonas aeruginosa* :**

*Pseudomonas aeruginosa* ou Bacille pyocyanique est un commensal du tube digestif, mais peu abondant chez le sujet sain, occasionne de nombreuses infections chez le sujet fragilisé. *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, il est très mobile grâce à une ciliature polaire en général monotriche.[23]

#### 2.2.5.4. Généralité sur les Bacilles à Gram positif

Les bactéries à **Gram positif** sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de Gram. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors mauves au microscope. [24]



### 3. METHODOLOGIE

#### 3.1. CADRE D'ETUDE

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire du CHU Gabriel TOURE situé dans le centre commercial de Bamako. En 1959, l'ancien Dispensaire Central de Bamako a été érigé en hôpital. Il sera baptisé «Hôpital Gabriel TOURE» en hommage au sacrifice d'un stagiaire Soudanais en médecine mort lors d'une épidémie de peste, maladie qu'il contracta au cours de son stage en 1934.

L'Hôpital Gabriel TOURE a été érigé en Etablissement Public à caractère Administratif (EPA) en 1992, doté de la personnalité morale et de l'autonomie de gestion. L'Hôpital Gabriel TOURE est l'un des onze (11) Etablissements Publics à caractère Hospitalier (EPH) institués par la loi n° 94-009 du 22 mars 1994 modifiée par la loi n°02-048 du 12 juillet 2002 portant création du Centre Hospitalier Universitaire (CHU).

Le laboratoire du CHU comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle pour les prélèvements et la parasitologie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde, un bureau du chef de service. En février 2002 une partie du laboratoire a été aménagée pour les activités de bactériologie et équipée en conséquence avec;

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des anses ;
- 3 automates d'hémocultures BACTEC® 9050 ;
- 1 incubateur à CO<sub>2</sub> pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO<sub>2</sub> pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20 E ;

- 1 centrifugeuse ;
- 1 congélateur de – 80° C pour la conservation des souches bactériennes ;
- 1 congélateur de – 20° C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des disques d'identification (Optochine, Bacitracine) des facteurs de croissance des *Haemophilus* ; des réactifs de sérogroupage des *Salmonella* ;
- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs ;
- 1 micro- ordinateur avec un système de communication Internet;
- 1 microscope Olympus CX31;
- 1 néphélomètre Mc Ferland pour la mesure de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de Kirby Bauer ;

Des petits matériels divers, des consommables et un ravitaillement régulier en milieux de culture et réactif permettant de réaliser des activités de bactériologie.

Le personnel comprend :

- 1 (un) pharmacien biologiste ;
- des pharmaciens ;
- des faisant fonction d'internes ;
- des techniciens supérieurs.
- des techniciens de laboratoire, répartis entre les différentes sections de biologie; dont deux de la section de bactériologie ont bénéficié d'un stage de formation à Baltimore (USA)
- Un personnel de surface.

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisées par un Professeur de bactériologie- virologie responsable de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP).

## **3.2. ETUDE**

### **3.2.1. Type de l'étude**

Il s'agit d'une étude rétrospective sur sept ans, basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives dues aux pathogènes responsables de septicémies et/ ou de méningites bactériennes dans les services de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE à Bamako (MALI).

Après avoir obtenu un consentement éclairé signé des parents, une hémoculture est réalisée chez chacun des enfants inclus.

Dans certains cas, et selon le contexte clinique, un examen cyto bactériologique du Liquide Céphalo- Rachidien (LCR) ou de liquides stériles d'autres sites (lominaire, pleural, articulaire, tissulaire et osseux) est réalisé.

### **3. 2. 2. Durée de l'étude**

L'étude a été réalisée avec les résultats d'une période de sept ans : de février 2002 à décembre 2008.

## **3.3. Critères d'inclusion et de non inclusion**

### **3.3.1. Critères d'inclusion**

Cette étude porte sur des enfants prélevés au niveau du site de prélèvement de CVD à la pédiatrie et répondant aux critères suivants :

- Etre âgé de moins de 17 ans,
- Etre hospitalisé ou traité en ambulatoire dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE,
- Avoir une température corporelle  $\geq 39^{\circ}$  C à l'admission et/ou avoir une "Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive" (SIBI) ;

- Le consentement éclairé des parents est obligatoire pour tous les enfants inclus dans l'étude et en plus l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est sollicité.

### **3.3.2. Critères de non- inclusion**

Ne prennent pas part à cette l'étude :

- Le nouveau- né malade n'ayant jamais quitté le CHU Gabriel TOURE depuis sa naissance ;

- L'enfant âgé de 13 à 16 ans incapable ou refusant de donner tout assentiment mais pas à cause de la gravité de sa maladie ;

- L'incapacité ou le refus du parent ou de l'accompagnant du patient à donner un consentement.

### **3.4. ASPECTS ETHIQUES :**

#### **3.4.1. Consentement des malades :**

Des assistants de recherche sont formés à la méthodologie de l'étude, particulièrement à l'obtention du consentement éclairé et à l'inclusion du malade dans l'étude. Ils travaillent en collaboration avec le tri et les salles de consultations du service Pédiatrie du CHU Gabriel TOURE pendant la durée de l'étude. Chaque pédiatre a à ses côtés un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusion, d'expliquer les modalités de l'étude, objectifs, risques et bénéfices pour l'enfant à la famille et/ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion. Les parents sont approchés dès l'admission ou plus tard dans les 12 heures qui suivent celle-ci. Après avoir obtenu le consentement du malade ou des parents le malade est inclus par l'assistant de recherche dans l'étude. Il est demandé aux enfants âgés de 13-17 ans, d'accord pour participer à l'étude de donner un consentement signé. Cependant, si un enfant extrémis est incapable de donner un consentement éclairé, le consentement des parents suffit pour participer. Toute information que

vous fournissez est gardée de façon confidentielle dans des armoires bouclées, bien que les résultats de la culture soient donnés à votre médecin traitant. Nous, nous engageons à ne pas utiliser les échantillons de sang prélevés pour d'autres recherches, cependant certaines souches de pathogènes pourront être gardées pour des investigations futures.

### **3.4.2. Inconvénients potentiels de cette étude**

Le risque pour les enfants qui participent est faible. Tous les participants sont soumis à une ponction de sang veineux pour l'hémoculture. Cette procédure peut avoir un risque dont la douleur, l'infection et l'hémorragie. A l'admission, beaucoup d'enfants vont subir une ponction sur indication du pédiatre et cette prise complémentaire peut avoir des risques. La procédure d'obtention d'autres liquides stériles d'autres sites (lombaire, pleural, articulaire, tissulaire et osseux) peut avoir des risques comme la douleur, l'infection et la détérioration tissulaire. Ces procédures sont réalisées à la discrétion du médecin traitant et ne sont pas dictées par ce protocole. La culture de ces liquides, qui est prise en charge par l'étude, n'entraîne pas de risque additionnel.

### **3.4.3. Bénéfices**

Sur le plan individuel, les nouveaux équipements en place avec un personnel qualifié permettront une recherche étiologique avancée, telle l'isolement des bactéries par culture, non habituellement utilisés au CHU Gabriel TOURE. Ceci aide considérablement, le médecin traitant à conduire un traitement étiologique, guidée par un antibiogramme de la maladie de l'enfant, ce qui est largement important par rapport aux risques mineurs ci-dessus évoqués. Tous les examens biologiques (hémocultures et autres cultures, et antibiogrammes) sont faits gratuitement chez les malades inclus. Le coût moyen de la prise en charge journalière d'un malade est estimé à 25000 Fcfa.

D'une manière générale, cette étude va permettre de relever le niveau, la qualité des prestations au CNAM, au CHU Gabriel TOURE et à l'INRSP par

l'amélioration du plateau technique (rénovation des locaux, équipements de laboratoire et de bureau). Aussi, deux techniciens de laboratoire (dont un pour CHU Gabriel TOURE et un pour l'INRSP) et un médecin superviseur en pédiatrie ont été formés en microbiologie ainsi qu'à l'usage des nouveaux équipements de laboratoire. Au terme de l'étude, l'épidémiologie des maladies concernées est mieux connue et des recommandations sont faites en vue d'améliorer leur prise en charge et pour permettre d'autres études dans le domaine de la vaccinologie (introduction de nouveaux vaccins).

#### **3.4.4. Respect des références bibliographiques**

Les textes des références bibliographiques n'ont pas fait l'objet de modifications. La propriété intellectuelle des auteurs de nos références bibliographiques a été respectée.

### **3.5. LA RECEPTION DES PRELEVEMENTS AU LABORATOIRE**

Dans le cadre de la démarche qualité, et pour une bonne traçabilité, les prélèvements reçus au laboratoire sont inscrits dans les registres de laboratoire et saisis sur support informatique. Il existe 4 registres :

- 1 registre pour l'enregistrement des hémocultures ;
- 1 registre pour l'enregistrement des LCR ;
- 1 registre pour la goutte épaisse ;
- 1 registre pour l'enregistrement des autres prélèvements (Liquide articulaire, liquide pleural, liquide sous cutané etc....)

Chaque registre comprend :

- une partie de renseignements sur le patient (nom et prénoms, sexe, âge, résidence)

- une partie de données des résultats préliminaires comportant les résultats des tests d'agglutination sur le LCR direct, les résultats du comptage en cellule de KOVA des GB et GR du LCR.

Les résultats de la coloration de Gram sur le LCR direct, sur les autres prélèvements et sur les flacons de BACTEC® des hémocultures positives, sont systématiquement portés dans le registre

- une partie comportant le résultat définitif des cultures du LCR, des hémocultures et des autres liquides et enfin le résultat de l'antibiogramme des souches de bactéries isolées.

### **3.6. PRESENTATION DES METHODES**

L'appareil BACTEC® 9050 et les bouillons de culture

- L'APPAREIL BACTEC® 9050

L'appareil « BACTEC® 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md. » et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bioMérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO<sub>2</sub>. Les microorganismes présents dans les bouteilles BACTEC® libèrent du CO<sub>2</sub> qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO<sub>2</sub> libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré-programmés. [25]

Le système « BacT- ALERT 3D Combination » fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacon est constamment surveillée par un

réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le BACTEC®. [26]

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

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

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



Figure 3 : BACTEC® 9050

#### - LES BOUILLONS DE CULTURE

Il existe 5 types de flacons BACTEC® :

##### 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™ 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/F LYTIC

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.

#### 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.

Ce flacon BD BACTEC™ PEDS PLUS /F étant utilisé pour sa conception à la détection des germes pathogènes courants chez les enfants, ceci exclut d'autres pathogènes dont la détection est assurée par les autres types de flacons BACTEC®. [27]

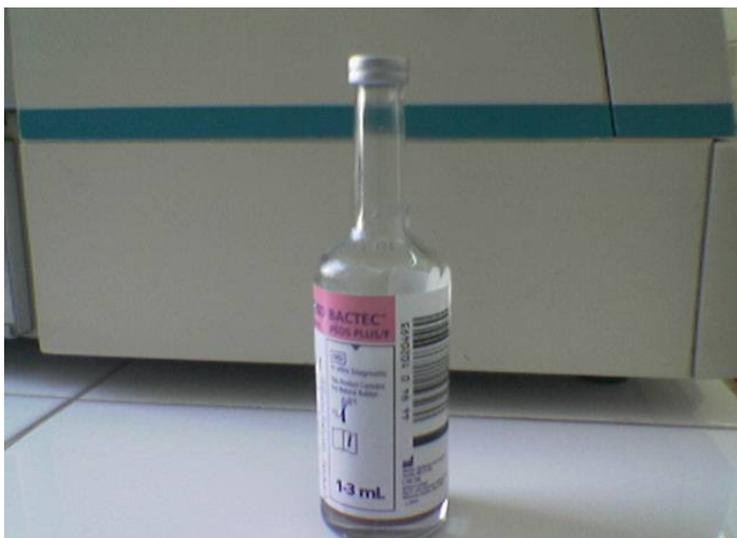


Figure 4: Flacon BD BACTEC™ PEDS PLUS/F

#### 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- caséine	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	0,60 %

### **3.7. PROTOCOLE DE TECHNIQUES DES HEMOCULTURES POSITIVES**

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le BACTEC® 9050 indique que l'hémoculture est positive :

– la bouteille du BACTEC® 9050 est retirée de l'appareil. Sa capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool, ensuite une aiguille de subculture est insérée à travers la capsule et immédiatement après préparer 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 ;

Sont écrits sur chaque boîte le numéro du BACTEC® ou le numéro d'identification GDH (Global Digital Health), les initiales du patient ainsi que la date ; reporter tous les résultats sur la fiche de travail ;

– nous procédons à la lecture de la coloration de Gram :

a. si aucun micro- organisme n'est détecté sur la lame de coloration, remettre la bouteille dans le BACTEC® 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, le flacon de BACTEC® doit 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 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. quand des micro-organismes sont détectés, ne plus remettre la bouteille dans le BACTEC® 9050. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures... ) ;

– le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

– lorsque des cocci à Gram positif en paires ou en chaînettes sont observés, placer un disque de Bacitracine (A) et un disque d'Optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture ;

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

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

– lorsqu'une croissance est observée, reporter sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. Faire une coloration de Gram sur ces colonies et reporter les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs genres de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;

– dans les cas où des Cocci à Gram positif sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :

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

b. si le micro- organisme est catalase- positive et ressemble au Staphylocoque (cocci à Gram positif en grappes), faire un test de coagulase. Si le micro- organisme est coagulase- positive, il faudrait l'enregistrer comme étant

*Staphylococcus aureus*. Si le micro- organisme est coagulase négative après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative;

c. lorsque le micro- organisme est catalase- négative, bêta- hémolytique, et Bacitracine- positif (inhibé par la Bacitracine), enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;

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

e. dans le cas où le micro- organisme est catalase négatif, bêta- hémolytique, et Bacitracine négatif, faire les tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* bêta- hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;

f. quand le micro- organisme est catalase négative, Optochine- positif (inhibé par le disque d'Optochine) et diplocoque à Gram positif, l'enregistrer comme

étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant, faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;

g. lorsque le micro- organisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci à Gram positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, effectuer le PYR test.

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

– quand le micro- organisme est un bacille à Gram positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer seulement «Bacille à Gram Positif» ;

– lorsque des bactéries à Gram négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :

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

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

c. quand le micro- organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et se

présente comme de petits bacilles à Gram négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*.

Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Dans le cas où l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;

– nous procédons à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

– enregistrer le résultat dans le registre de laboratoire et informer le médecin du patient de l'identification finale.

### **3.8. TECHNIQUES UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION DES BACTERIES**

#### **3.8.1. Procédure de la coloration :**

1. Utiliser une lame propre sur laquelle sont écrits le nom du patient et l'identification du spécimen avec un crayon de papier. Ne pas utiliser de stylo à bille ;
2. Etaler l'échantillon en un frottis mince sur la lame de verre afin de 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. Recouvrir le frottis de lame avec le Violet de gentiane pendant 30 à 40 secondes ;
5. Verser le surplus de la solution de Violet de gentiane et rincer la lame avec un jet d'eau faible et ensuite égoutter l'excès d'eau. Utiliser un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;

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

7. Verser la solution de Lugol de la lame et la rincer avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;

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

9. Immédiatement après, rincer la lame avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté ;

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

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

11. Verser la safranine qui une minute plus tard est rincée en tenant la lame sous un faible jet d'eau, l'excès d'eau est égoutté. Prudemment, sécher la lame avec du papier buvard. Ne pas surtout froter 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 à Gram positif en grappes = Staphylocoques

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

Cocci à Gram positif en chaînettes = Streptocoques.

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

Cocci à Gram positif en paires = *Streptococcus pneumoniae* ou Enterococcus

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

Bacilles à Gram positif : égale plusieurs micro-organismes

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

Cocci à Gram négatif en paires = *Neisseria*

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

Bacilles à Gram négatif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles à Gram négatif comprenant *Haemophilus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* sont des bacilles courts et minces ; les bactéries entériques (*Escherichia*, *Klebsiella* ; *Salmonella* ; *Shigella*) sont plus longues, plus épaisses et sont mieux colorées aux extrémités qu'au centre.

### **3.9. Tests biochimiques et métaboliques :**

#### **3.9.1. Observation de la réaction d'hémolyse :**

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

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

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

Alpha-hémolyse : C'est une lyse incomplète des globules rouges du sang.

L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra verdâtre.

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

Parmi les exemples de bactéries Bêta-hémolytique on retient les Streptocoques du Groupe A et B, le *Staphylococcus aureus* ainsi qu'*Escherichia coli*.

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

Parmi les exemples de bactéries Gamma ou non-hémolytique on retient quelques espèces de Streptocoques ainsi que *Neisseria meningitidis*.

### **3.9.2. Catalase :**

Principe :

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

Matériels et réactifs utilisés :

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

Procédure :

Sur une lame de verre propre, on place une colonie bactérienne. On enlève la colonie bactérienne de la gélose avec une anse en faisant très attention pour ne pas prendre de la gélose.

On place une goutte à 3% de peroxyde d'hydrogène sur une colonie bactérienne.

Une réaction positive est indiquée par des bulles qui se produisent en 10 secondes.

Interprétation :

Réaction positive = Formation de bulles (exemple : Staphylocoque)

Réaction négative = Aucune formation de bulles en 10 secondes (exemple : Streptocoque)

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

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

### **3.9.3. 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

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 l'incubateur à CO<sub>2</sub>.

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 celui de <<bile solubility>> sont tous les deux négatifs, le micro-organisme identifié n'est pas *Streptococcus pneumoniae*. Si l'un ou l'autre des tests est positif, l'micro-organisme est identifié comme étant *Streptococcus pneumoniae*.

### **3.10. 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 avec une 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 micro-organisme est sensible).

Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon 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  $-20^{\circ}$  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) est utilisée pour les tests *Haemophilus*. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests ;

3. Enlever du réfrigérateur les disques pour le test de sensibilité afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle. Au paravant 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. Vérifier les dates d'expiration sur les boîtes d'antibiotiques.

Ne pas utiliser de disques périmés ;

4. Sélectionner au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Toucher le sommet de chaque colonie avec une anse et les transférer dans un tube de solution saline. Ajuster 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. Plonger un écouvillon stérile dans la suspension ajustée. Il est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au- dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. Inoculer la surface entière de la boîte de gélose en faisant tourner la boîte d'approximativement d'un angle de 60° C et ensemenecer de nouveau. Faire tourner la boîte et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;

6. Inoculer une boîte pour *Haemophilus influenzae* ; pour *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ; deux boîtes de gélose sont inoculées pour les autres bacilles à Gram négatif ;

7. Laisser l'excès d'humidité s'absorber par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. Placer les disques d'antibiotiques sur la boîte en utilisant des pinces stériles. Le disque est pressé sur la surface de la gélose avec des pinces stériles pour s'assurer du contact complet avec la

surface de la gélose. Ne plus enlever le disque une fois qu'il est arrivé au contact avec la surface de la gélose parce que l'antibiotique diffuse dans la gélose presque immédiatement.

Utiliser souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques ;

8. Les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

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

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

Pour *Haemophilus influenzae*: Ampicilline 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ;

Pour les autres bacilles à Gram négatif

Boîte de gélose N°1- Ampicilline 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.

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

9. Laisser 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 l'incubateur à CO<sub>2</sub> 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. Mesurer 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.

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

Avec le Cotrimoxazole, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. Nous ne tiendrons pas compte de la faible croissance, nous devons lire seulement les limites de la croissance en abondance ;

Se référer à la « carte de référence » pour l'interprétation des tests ;

Les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 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 microorganismes 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 utilisés pour ces micro-organismes

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

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

## 4-RESULTATS :

### 4.1.1. Résultats préliminaires

### 4.1. Résultats globaux

De 2002 à 2008, 21923 hémocultures ont été réalisées.

**TABLEAU I :** Résultats préliminaires des hémocultures selon la coloration de Gram

	<b>Bacille à Gram négatif</b>	<b>Bacille à Gram positif</b>	<b>Cocci à Gram négatif</b>	<b>Cocci à Gram positif</b>	<b>LEVURES</b>
<b>2002</b>	<b>113</b>	<b>05</b>	<b>00</b>	<b>232</b>	<b>01</b>
<b>2003</b>	<b>273</b>	<b>09</b>	<b>07</b>	<b>328</b>	<b>01</b>
<b>2004</b>	<b>193</b>	<b>14</b>	<b>06</b>	<b>197</b>	<b>01</b>
<b>2005</b>	<b>296</b>	<b>19</b>	<b>01</b>	<b>193</b>	<b>01</b>
<b>2006</b>	<b>317</b>	<b>33</b>	<b>07</b>	<b>384</b>	<b>00</b>
<b>2007</b>	<b>119</b>	<b>31</b>	<b>11</b>	<b>284</b>	<b>00</b>
<b>2008</b>	<b>197</b>	<b>79</b>	<b>48</b>	<b>403</b>	<b>00</b>
<b>Total</b>	<b>1508(39,6%)</b>	<b>190(04,9%)</b>	<b>80(02,1%)</b>	<b>2021(53,1%)</b>	<b>04(0,10%)</b>

Les Cocci à Gram positif ont la plus grande fréquence avec 53,1%

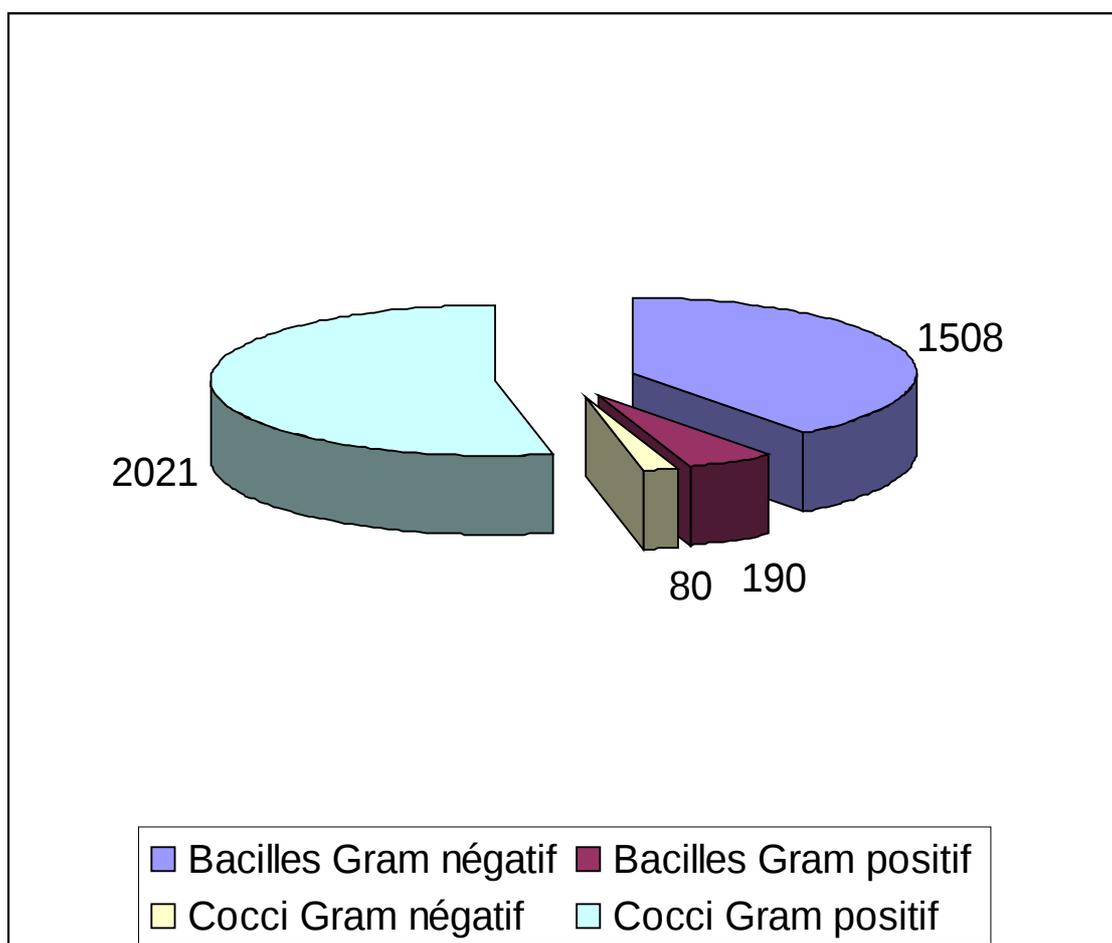


Figure 5 : Répartition des germes selon la coloration de Gram

#### 4.1.2. Résultats après culture:

TABLEAU II: Résultats des hémocultures de 2002 à 2008

DESIGNATION	ANNEE							TOTAL	%
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008		
Total	1978	1672	1843	4097	4375	2913	4962	21840	100
Résultats négatifs	1413	1246	1409	3342	3672	2438	4249	17768	81.35
Résultats positifs	566	426	434	755	703	475	713	4072	18.64
Nature des germes isolés									
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	80	89	91	154	194	155	189	952	04.35
<i>Haemophilus influenzae</i>	68	45	73	144	80	32	41	483	02.21
<i>Salmonella enterica</i>	40	54	36	97	112	60	66	465	02.12
<i>Salmonella Typhi</i>	71	20	10	20	21	10	13	165	0.75
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	26	27	52	32	08	13	189	0.86
<i>Escherichia coli</i>	20	07	11	20	19	08	20	105	0.48
<i>Salmonella</i> du groupe B	20	09	09	37	29	16	34	154	0.70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	03	05	04	04	05	02	26	0.11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	06	02	02	05	01	06	25	0.11
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	02	08	01	00	00	00	01	12	0.05
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	03	06	01	00	00	00	01	11	0.05
<i>Neisseria meningitidis</i> du groupe A	01	04	04	02	09	13	45	78	0.35
<i>Streptococcus β hémolytique</i> du groupe A	03	02	03	02	03	02	05	20	0.09
<i>Enterococcus spp</i>	01	01	05	03	03	01	12	26	0.11
<i>Streptococcus</i> du groupe B	04	01	01	00	00	00	00	06	0.02
<i>Morganella morganii</i>	01	02	02	02	00	00	00	07	0.03
<i>Citrobacter species</i>	02	01	01	00	01	00	00	05	0.02
<i>Citrobacter freundii</i>	02	00	02	02	02	02	04	14	0.06
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	01	00	00	00	00	03	0.01
<i>Salmonella arizonae</i>	01	01	01	00	00	00	00	03	0.01
<i>Salmonella paraTyphi</i> A	01	01	01	02	02	04	00	11	0.07
<i>Pseudomonas putida</i>	00	01	01	00	01	00	00	03	0.01
<i>Salmonella paraTyphi</i> C	01	00	01	02	01	02	00	07	0.03
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	04	04	00	00	10	0.04
<i>Neisseria meningitidis</i> du groupe C	00	00	01	00	00	00	00	01	0.004
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	00	00	01	01	00	01	00	03	0.01
<i>Proteus mirabilis</i>	01	00	00	01	00	00	01	03	0.01
<i>Acinetobacter baumannii</i>	00	00	00	01	00	00	00	01	0.004
<i>Acinetobacter calco .var anitrat</i>	00	00	00	02	01	02	03	08	0.03
<i>Serratia liquefaciens</i>	00	00	00	00	01	00	00	01	0.004
<i>Flavobacter odoratum</i>	00	00	00	00	02	00	00	02	0.009
<i>Aeromonas spp</i>	00	00	00	00	01	00	00	01	0.004
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	01	00	01	00	00	00	03	0.01
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	00	00	01	00	00	00	00	01	0.004
<i>Shigella spp</i>	00	00	00	01	01	00	00	02	0.009
<i>Streptococcus spp</i>	00	00	00	02	02	00	00	04	0.01
<i>Enterobacter sakazakii</i>	01	00	00	00	00	00	00	01	0.004
<i>Salmonella choleraesuis</i>	01	00	00	00	00	00	01	02	0.009
<i>Pseudomonas cepacia</i>	01	00	00	00	00	00	00	01	0.004
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	01	00	00	00	00	00	00	01	0.004
<i>Chromobacterium violaceum</i>	01	00	00	00	00	00	00	01	0.004
Cocco Bacille Gram Négatif	01	00	00	00	00	00	00	01	0.004
Contaminants :									
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	143	119	123	156	143	128	180	992	04.54
Bacilles Gram Positif (BGP)	54	16	18	40	30	25	76	259	01.18
Levures	01	01	01	01	00	00	00	04	0.01

**TABLEAU III : Répartition annuelle des hémocultures en fonction de leur positivité**

		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	Total
<b>Bactec positifs</b>	<b>Cultures Positives</b>	566	426	434	755	703	475	713	4072
	<b>Cultures stériles</b>	09	25	08	03	30	03	13	83
<b>Bactec négatifs</b>		1413	1246	1409	3342	3672	2438	4249	17768
<b>Total</b>		1979	1672	1843	4097	4375	2913	4962	21923

Avec 21923 prélèvements, le nombre de BACTEC® positifs est de 4155 soit (18,95%), le nombre de BACTEC® négatifs 17768 soit (81,04%).

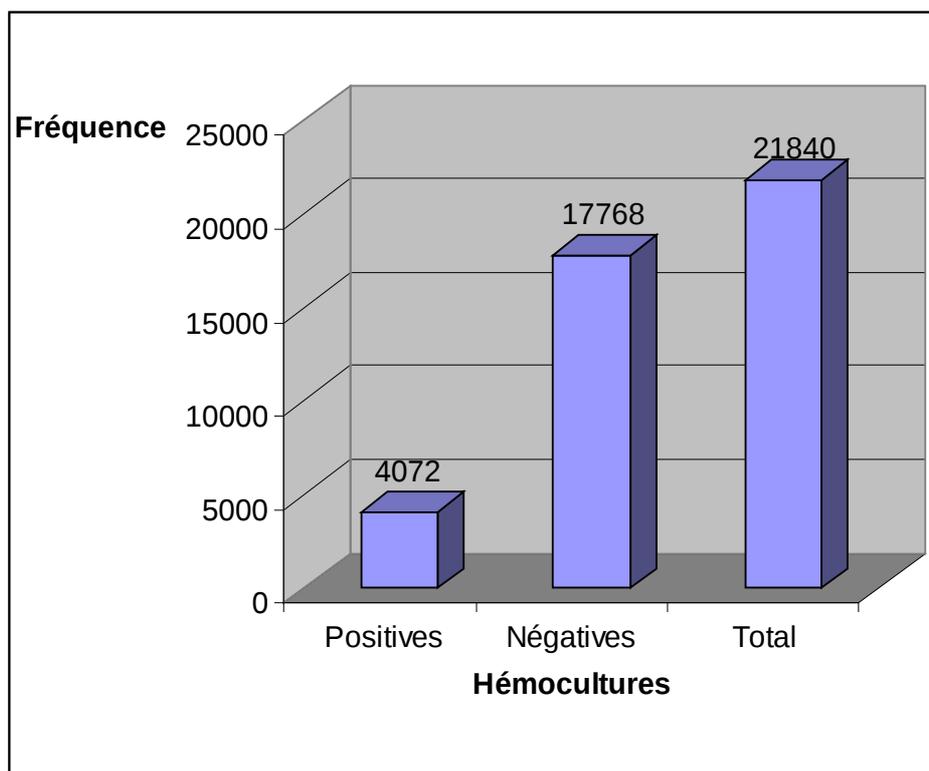


Figure 6: Répartition des hémocultures selon leur positivité

## 4.2. Aspects bactériologiques

### 4.2.1. Les bactéries isolées :

Les bactéries isolées des hémocultures avant la culture ont été des Cocci à Gram positif au nombre de 2021 (53,1%), des bacilles à Gram négatif au nombre de 1508 (39,6%), des bacilles à Gram positif au nombre de 190 (04,9%) et des Cocci à Gram négatif au nombre de 80 (02,1%) et 0,1% de levures.

Après la culture finale, parmi les bacilles à Gram négatif nous avons identifié des entérobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae*).

Parmi les Cocci à Gram positif, nous avons identifié *Staphylococcus aureus*, des *Staphylococcus* à coagulase négative, *Streptococcus sp* et *Enterococcus sp*.

Parmi les Cocci à Gram négatif, nous avons identifié, *Neisseria meningitidis*.

**TABLEAU IV: Distribution des principales bactéries isolées**

<b>Morphologie</b>	<b>Espèce</b>	<b>Effectif</b>	<b>fréquence</b>
<b>Cocci à Gram positif</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>952</b>	<b>04,35%</b>
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	<b>189</b>	<b>0,86%</b>
	<i>Bacilles à Gram négatif</i>		
<b>Bacilles à Gram négatif</b>	<i>Salmonella enterica</i>	<b>784</b>	<b>3,57%</b>
	<i>Escherichia coli</i>	<b>105</b>	<b>0,48%</b>
	<i>Haemophilus influenzae type b</i>	<b>483</b>	<b>02,21%</b>

Parmi les principaux germes isolés, les bacilles à Gram négatif ont le plus grand nombre avec *Salmonella enterica* **784 (3,57%)**, *Escherichia Coli* **105 (0,48%)**, *Haemophilus influenzae type b* **483 (02,21%)**

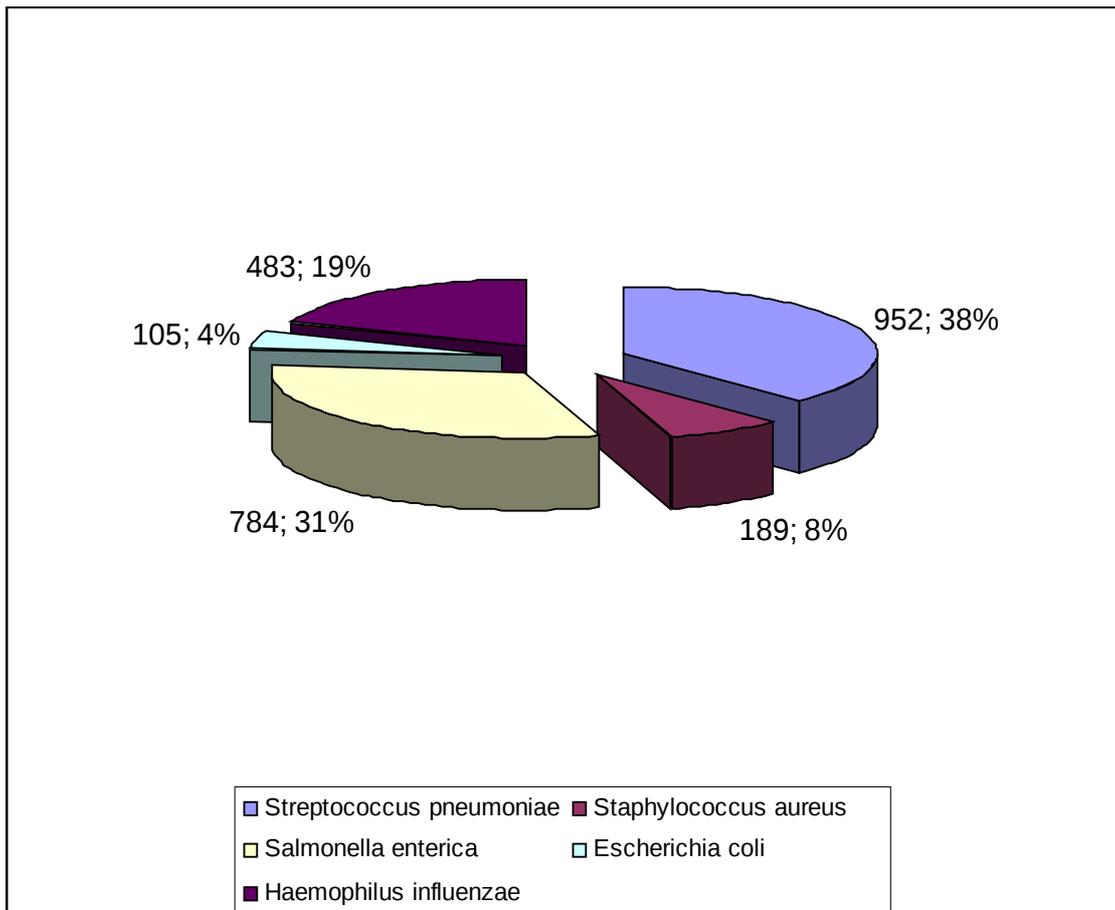


Figure 7 : Distribution des principaux germes isolés selon l'espèce

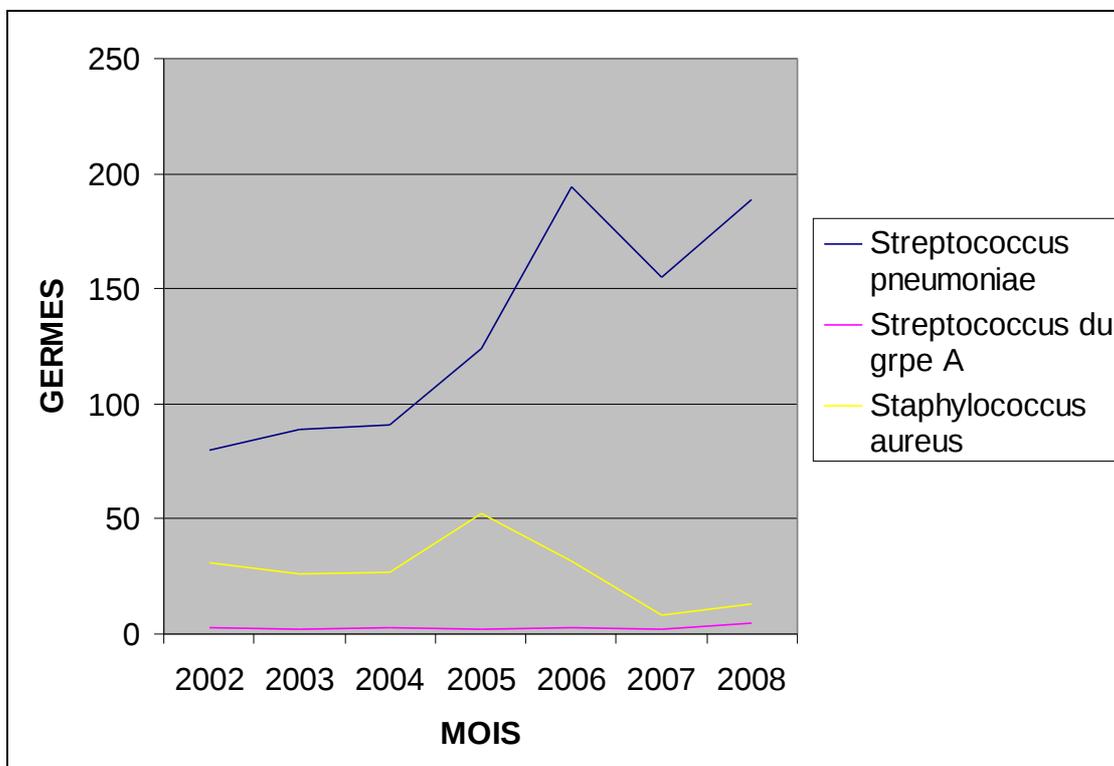


Figure 8 : Evolution des Cocci à Gram positif de 2002 à 2008

*Streptococcus pneumoniae* est le chef de fil des Cocci à Gram positif

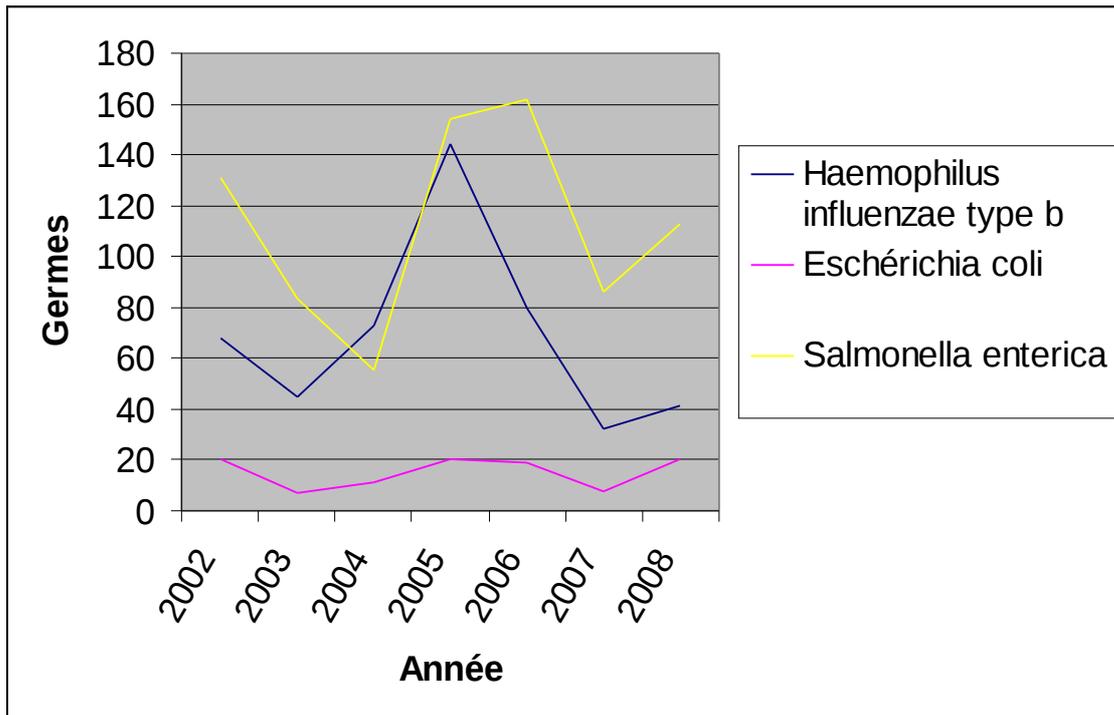


Figure 9: Evolution des Bacilles Gram négatif de 2002 à 2008

*Salmonella enterica* est le plus fréquemment isolé parmi les Bacilles à Gram négatif, et il a atteint sa plus grande fréquence en 2006 soit 162 germes isolés

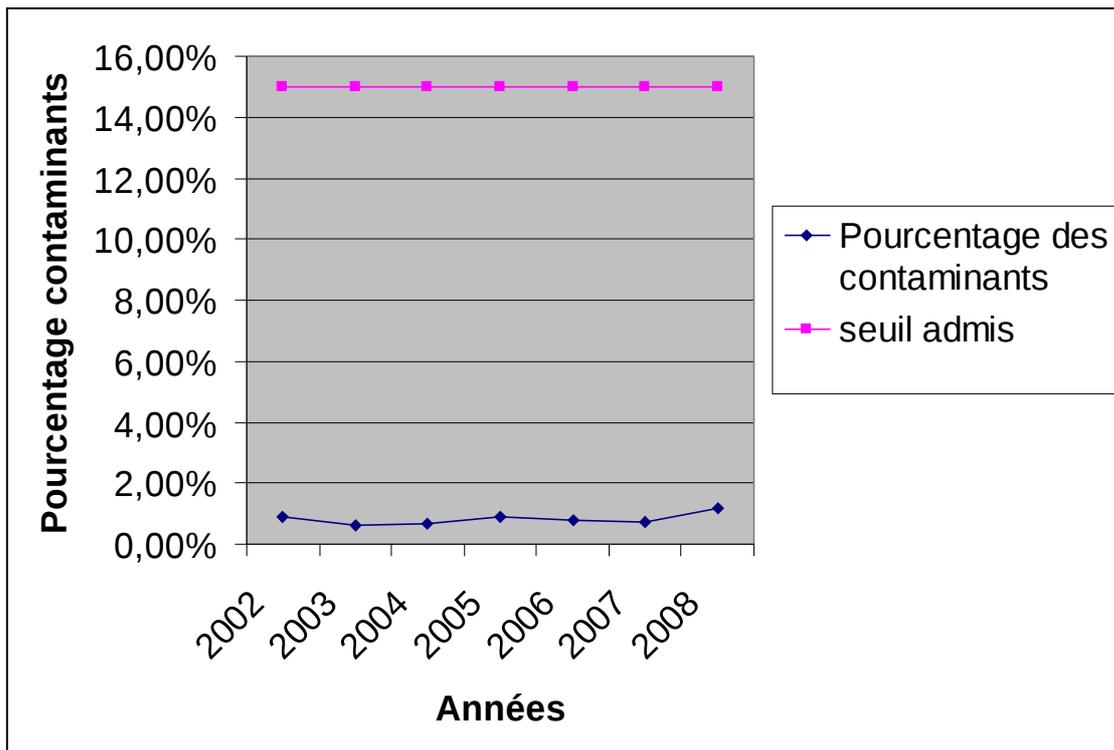


Figure 10 : Evolution des contaminants de 2002 à 2008

Le pourcentage des contaminants est très inférieur au seuil admis

#### 4.2.2. Sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées

**TABLEAU V : Evaluation de la sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* aux principaux antibiotiques usuels**

ATB	PENI G			CIPRO			CEFT			ERY			AMPI			OXA		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R				S	I	R	S	I	R
Années																		
<b>2002</b>	42	00	00	14	42	04	62	00	00	49	01	05	16	00	00	37	07	05
<b>2003</b>	46	00	00	03	00	00	31	00	00	55	01	00	01	00	00	56	00	00
<b>2004</b>	60	00	00	01	00	00	35	00	00	60	12	02	03	00	00	58	02	00
<b>2005</b>	136	00	00	21	00	00	54	00	00	120	05	07	66	00	00	118	00	02
<b>2006</b>	160	00	00	78	00	00	x	x	x	87	00	03	194	00	00	167	00	00
<b>2007</b>	153	00	00	60	00	00	x	x	x	158	00	06	153	00	00	132	08	02
<b>2008</b>	116	00	00	34	42	04	15	00	00	136	01	03	82	00	00	167	00	04
<b>TOTAL</b>	<b>713</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>211</b>	<b>84</b>	<b>08</b>	<b>148</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>665</b>	<b>20</b>	<b>26</b>	<b>515</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>736</b>	<b>17</b>	<b>13</b>

*Streptococcus pneumoniae* a été sensible à certaines molécules testées :  
Oxacilline, Pénicilline G, Ceftriaxone, Erythromycine et Ampicilline

**TABLEAU VI : Evaluation de la Sensibilité d'*Haemophilus influenzae* type b  
aux antibiotiques usuels**

ATB	AMPI			CIPRO			CEFT						COTRI			CHLO		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R				S	I	R	S	I	R
Années																		
<b>2002</b>	49	0	0	43	0	0	54	0	0	2	0	0	1	0	1	29	0	21
		3	6		1	2		0	3	6	5	5	3	6	6			2
<b>2003</b>	33	0	0	36	0	0	30	0	0	2	0	0	1	0	1	22	0	05
		1	5		0	0		0	0	8	5	0	8	4	2			1
<b>2004</b>	81	0	0	25	0	0	76	0	0	1	0	0	1	0	0	56	0	21
		0	7		0	0		0	0	8	2	5	9	1	5			2
<b>2005</b>	54	0	0	X	X	X	63	0	0	X	X	X	X	X	X	39	0	22
		0	7					0	0									0
<b>2006</b>	77	0	0	X	X	X	80	0	0	X	X	X	X	X	X	53	0	17
		0	3					0	0									0
<b>2007</b>	33	0	0	33	0	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	29	0	02
		0	0		0	0												1
<b>2008</b>	38	0	0	X	X	X	43	0	0	X	X	X	X	X	X	32	0	03
		1	6					0	2									5
<b>TOTAL</b>	<b>36</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>26</b>	<b>1</b>	<b>91</b>
<b>L</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	

*Haemophilus influenzae* type b a été sensible à certaines molécules testées  
Ceftriaxone, Ampicilline, Ciprofloxacine et Chloramphénicol.

**TABLEAU VII : Evaluation de la sensibilité de *Salmonella enterica* aux principaux antibiotiques usuels**

ATB	AMPI			CIPRO			CEFT			GENT			COTRI			CHLO		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R				S	I	R	S	I	R
Années																		
<b>2002</b>	58	0	72	13	0	0	12	1	1	69	38	35	50	0	60	60	0	69
		0		1	0	0	9	1	6					4			2	
<b>2003</b>	28	0	40	69	0	0	68	0	0	36	13	15	20	0	38	14	0	32
		1			0	0		0	1					2			0	
<b>2004</b>	16	0	30	40	0	0	42	0	0	05	11	36	15	0	32	22	0	32
		4			3	7		5	1					3			0	
<b>2005</b>	28	0	74	56	0	4	96	0	0	20	10	23	17	1	72	38	0	47
		2			3	5		4	5					0			1	
<b>2006</b>	60	0	69	13	0	0	13	0	0	42	32	57	11	7	70	00	0	65
		3		0	1	0	3	0	0					4			0	
<b>2007</b>	33	0	52	76	0	0	10	1	0	60	12	07	20	0	32	40	0	43
		2			2	2	0	5	2					0			1	
<b>2008</b>	48	0	57	10	0	0	10	0	0	34	02	01	47	0	41	55	0	47
		0		0	0	1	1	0	0					1			0	
<b>TOTAL</b>	27	1	39	<b>60</b>	0	5	<b>66</b>	3	2	26	11	17	18	9	34	22	0	335
<b>L</b>	1	2	4	<b>2</b>	9	5	<b>9</b>	5	5	6	8	4	0	4	5	9	4	

*Salmonella enterica* a été sensible à Ceftriaxone, Ciprofloxacine.

**TABLEAU VIII : Evaluation de la Sensibilité de *Staphylococcus aureus*  
aux principaux antibiotiques usuels**

ATB	PENI G			CIPRO			CEFT						COTRI			OXA		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R				S	I	R	S	I	R
Années																		
<b>2002</b>	08	00	19	14	02	00	31	00	00	10	06	03	19	00	01	15	02	13
<b>2003</b>	06	00	17	03	00	01	20	01	02	08	01	00	10	01	04	09	01	09
<b>2004</b>	02	00	17	X	X	X	21	03	01	00	00	02	02	00	02	16	00	02
<b>2005</b>	03	00	28	X	X	X	30	02	02	X	X	X	X	X	X	30	00	02
<b>2006</b>	01	00	21	X	X	X	21	01	02	X	X	X	X	X	X	23	00	00
<b>2007</b>	01	00	09	X	X	X	10	00	00	X	X	X	X	X	X	07	01	02
<b>2008</b>	02	00	14	X	X	X	17	00	00	X	X	X	X	X	X	16	00	00
<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	<b>00</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>02</b>	<b>01</b>	<b>15</b>	<b>07</b>	<b>07</b>	<b>18</b>	<b>07</b>	<b>06</b>	<b>31</b>	<b>01</b>	<b>07</b>	<b>11</b>	<b>04</b>	<b>28</b>
			<b>5</b>				<b>0</b>									<b>6</b>		

Staphylococcus aureus a été sensible à Ceftriaxone, Ciprofloxacine, Oxacilline.

**TABLEAU IX : Evaluation de la sensibilité d'*Escherichia coli***  
aux principaux antibiotiques usuels

ATB	AMPI			CIPRO			CEFT			GENT			COTRI			CHLO		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R				S	I	R	S	I	R
Années																		
<b>2002</b>	01	01	16	15	02	01	17	00	01	08	05	05	13	01	04	06	01	06
<b>2003</b>	02	00	05	07	00	00	07	00	00	07	00	00	03	00	04	01	00	06
<b>2004</b>	04	02	11	07	00	09	09	06	02	04	05	08	03	03	04	07	02	08
<b>2005</b>	03	00	17	16	02	02	15	03	02	02	08	09	01	03	16	07	06	07
<b>2006</b>	02	01	16	10	00	00	17	00	02	09	05	05	01	01	17	08	02	07
<b>2007</b>	01	01	06	06	00	02	07	00	01	05	02	01	02	00	03	05	00	03
<b>2008</b>	02	00	12	14	00	00	14	00	00	09	01	02	05	00	07	09	01	05
<b>TOTAL</b>	15	05	83	75	04	14	86	09	08	44	26	30	28	08	55	43	12	42

*Escherichia coli* a été sensible à Ceftriaxone et Ciprofloxacine.

## 5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

Cette étude est une étude rétrospective sur sept ans basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives dues aux pathogènes responsables de septicémies et/ ou de méningites bactériennes dans les services de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE à Bamako (MALI).

Elle porte sur des enfants prélevés au niveau du site de prélèvement de CVD à la pédiatrie et répondant aux critères suivants :

- Etre âgé de moins de 17 ans,
- Etre hospitalisé ou traité en ambulatoire dans le service de pédiatrie du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURE,
- Avoir une température corporelle  $\geq 39^{\circ}$  C à l'admission et/ou avoir une "Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive" (SIBI) ;

Le consentement éclairé signé des parents est obligatoire pour tous les enfants inclus dans l'étude et en plus l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est sollicité.

Les enfants âgés de 13 à 16 ans ne pouvant pas donner leur consentement à cause de l'état de gravité de leur maladie sont aussi inclus.

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

### 5. 1. Aspects Méthodologiques :

Les prélèvementsensemencés sur le bouillon BACTEC® adapté au développement des germes responsables de septicémies et/ ou d'infections bactériennes invasives 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.

Chez OUOLOGUEM Y. 2008 « Bilan de deux années d'hémoculture au laboratoire de biologie médicale du Point – G » les hémocultures ont été réalisées sur bouillon Hémoline performance Duo pour la plupart ou sur bouillon cœur-cervelle. [28]

## **5. 2. Aspects Résultats :**

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

Le nombre total de prélèvements effectués étaient de : 21923 sur sept ans.

SIDIBE M. 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 ». [29]

SAMAKE M. a analysé 2198 hémoculture sur une année, étude réalisée dans le cadre « pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital Gabriel TOURE : Aspects méthodologiques ». [30]

Dans notre étude, sur les 21923 prélèvements effectués nous avons obtenu 4155 BACTEC® positif, le nombre de germes isolés était de 4072.

OUOLOGUEM Y. a eu sur 1161 hémocultures 211 (18,1 %) positive étude réalisée dans le cadre du « Bilan de deux années d'hémoculture au laboratoire de biologie médicale du point – G. Thèse de Pharmacie 2008 » [28]

SOUDE SENA GBENOU-ABEBOLA AM. Au centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga de Cotonou, a eu sur un total de 361 prélèvements pour hémoculture analysés, 108 positifs soit un taux de positivité de 29,9%. [31]

SAMAKE M. a eu sur 2198 hémocultures 585 positives soit 26,61%. [30]

MAIGA II, SIDIBE .M, MAIGA .A et ROCHEREAU. A. Ont obtenu un taux de positivité de 15,5% sur 1 779 hémocultures réalisées dans le cadre «Les bactéries isolées par hémocultures à l'hôpital du point G en 2004 » [32] ce taux est légèrement inférieur à celui de notre étude (18,57%).

L'équipe d'ANAGONOU S Y. à Cotonou (1987-1990). a trouvé un pourcentage de positivité de 28,3%, sur 371 prélèvements [33] qui est supérieur à celui de notre étude.

DIDJA, à Dakar en 1980 [34], GOULET en France en 1983 [35] ont obtenu respectivement des taux de positivité de 14,7% et 15%.

DOSSO à Abidjan en 1988 [36], DJOFFON à Dakar en 1980 [37] ont obtenu respectivement des taux de positivité nettement supérieurs au nôtre : 28,13%, 26,7%

Dans notre étude le nombre de flacons de Bactec négatifs était de 17768 soit 81.04%

Au terme de la première étape de culture, une coloration de Gram est effectuée sur tous les flacons positifs, les résultats suivants ont été obtenus :

- Bacilles à Gram négatif : 1508 soit 39,69%
- Bacilles à Gram positif : 190 soit 05,00%
- Cocci à Gram négatif : 90 soit 02,10%

- Cocci à Gram positif : 2021 soit 53,19%

Par contre OUOLOGUEM Y. a obtenu 39,4% de Bacilles à Gram négatif, 54,7% de Cocci à Gram positif, et 1% de Cocci à Gram négatif.

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 à 4072 germes isolés soit 18,57%

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%. [38]

Le nombre de contaminants dans notre étude est de 1255 soit 5,74%. Ce taux est nettement inférieur à la valeur admise (15%).

Il est à noter que 83 flacons de Bactec positifs ont donné une culture 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 (Plasmodiums....).

Chez SAMAKE M, 17 flacons de Bactec positifs ont « in fine » donné une culture finale stérile sur 2198 hémocultures analysées sur une année. [30]

Dans notre étude La fréquence d'isolement des principaux germes était la suivante :

*Streptococcus pneumoniae* 952 soit 04,35 %

*Haemophilus influenzae* type b 483 soit 02,21%

*Salmonella enterica* 784 soit 3,58%

*Staphylococcus aureus* 189 soit 0,86%

*Escherichia coli* 105 soit 0,48%

On retrouve les mêmes principaux germes des hémocultures comme dans les études de GORO D. à Bamako 2002, portant sur les infections nosocomiales [39], de YARRO F. sur les septicémies à l'hôpital national du point G à Bamako 2000. [40]

Dans notre étude *Streptococcus pneumoniae* était le chef de file de ces pathogènes, alors que chez d'autres auteurs ce sont les entérobactéries qui prédominent.

Chez BAUDAT V d'Arnex-sur-Orbe « Hémocultures positives à l'Hôpital Cantonal de Fribourg, 1997-1998 : signification clinique, microbiologie, épidémiologie, traitement et pronostic en 2002. » 215 patients ont été à l'origine de 232 épisodes d'hémocultures positives. *Escherichia coli* (22%), *Staphylococcus aureus* (21%), les staphylocoques coagulase-négative (10%), *Streptococcus pneumoniae* (7%) et *Candida albicans* (6%) étaient les pathogènes les plus fréquents.

Les staphylocoques coagulase-négative ont été souvent isolés (17% des hémocultures positives), mais ont été considérés comme contaminants dans 38% des cas. [41]

Sensibilité aux antibiotiques des espèces les plus fréquemment isolées :

- *Streptococcus pneumoniae* :

La pénicilline G est la molécule de choix dans le traitement des infections à streptocoques, selon BERCHE P, dans le cadre de l'étude sur « Les salmonelles ». [21]

Dans notre cas parmi les molécules testées Oxacilline, Pénicilline, Erythromycine et ampicilline ont été les plus actives sur nos souches de *Streptococcus pneumoniae*

Nos souches d'*Haemophilus* ont été sensibles à la Ceftriaxone (98,69%), Ampicilline (90,32%) et Chloramphicol (70,65%).

Nos souches de *salmonella enterica* ont été sensibles à la Ceftriaxone et à la Ciprofloxacine, par contre OUOLOGUEM Y a rapporté qu'une souche de *Salmonella enterica* sur deux a été sensible au Chloramphénicol. [28]

Nos souches de *Staphylococcus aureus* ont été sensibles à la Ceftriaxone, Ciprofloxacine, et à l'Oxacilline.

La résistance des souches de *Staphylococcus aureus* à la Pénicilline G est largement rapportée par les données de la littérature; 90 à 95% des souches sont résistantes à la Pénicilline G. [42, 43, 44, 45]

Nos souches d'*Escherichia coli* ont été sensibles à la Ceftriaxone et à la Ciprofloxacine.

Par contre plusieurs auteurs rapportent une nette augmentation de souches d'*Escherichia coli* productrices d'une pénicillinase leur conférant une résistance aux aminopénicillines [46, 47].

## **6. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :**

### **6. 1. CONCLUSION :**

Notre étude rétrospective effectuée au laboratoire d'analyses médicales du CHU Gabriel TOURE de 2002 à 2008 est une étude analytique des hémocultures en milieu hospitalier.

Cette étude qui avait pour but d'identifier les bactéries isolées d'hémocultures et d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques nous a permis d'aboutir aux conclusions suivantes :

Avec 21923 prélèvements ont aboutit aux résultats suivants :

- 4155 BACTEC® positifs dont 4072 germes isolés (18,57%) des prélèvements et 83 cultures stériles

- 17768 BACTEC® négatifs soit (81,04%) des prélèvements

Parmi les micro-organismes isolés, les Cocci à Gram positif occupent le premier rang : les principaux Cocci à Gram positif isolés des hémocultures sont *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*

Parmi les bacilles à Gram négatif ce sont *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* qui ont prédominé.

A côté des principales bactéries, *Neisseria meningitidis* a été isolé à une fréquence faible.

Certains antibiotiques ont été actifs sur nos souches et par contre elles ont été résistantes ou intermédiaires à d'autres antibiotiques testés :

Nos souches de *Streptococcus pneumoniae* ont été sensibles à Oxacilline, Ceftriaxone, Pénicilline, Ciprofloxacine, Erythromycine et Ampicilline.

Nos souches d'*Haemophilus influenzae* type b ont été sensibles à Ceftriaxone, Ampicilline et Chloramphénicol, Ciprofloxacine.

Nos souches de *Salmonella enterica* ont été sensibles à Ceftriaxone, Ciprofloxacine.

Nos souches de *Staphylococcus aureus* ont été sensibles à Ceftriaxone, Ciprofloxacine, Oxacilline.

Nos souches d'*Escherichia coli* ont été sensibles à Ceftriaxone et Ciprofloxacine.

Nous avons par ailleurs pu constater que la prise en charge des bactériémies au CHU Gabriel TOURE n'est pas moins bonne que celle rapportée par certains hôpitaux américains de grande renommée, ce qui est très satisfaisant, mais qu'il

y avait encore place pour une amélioration. C'est un défi que nous devons relever.

## **6.2. RECOMMANDATIONS :**

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

### **Aux autorités de tutelle du laboratoire du CHU Gabriel TOURE et à nos partenaires :**

- D'assurer la formation de l'ensemble des techniciens du CHU Gabriel TOURE 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.

## 7. REFERENCES

- 1- **FAUCHERE JL**, 1997. Techniques de bactériologie clinique. Edition marketing S.A: 77 - 79.
- 2- **PHILIPPON A, PAUL G, NEVOT P**, 1983. L'hémoculture. Rev Prat ; 33 : 1929- 1938.
- 3- **CHIRON JP, DENIS F, SAMB A, PRINCE-DAVID M**, 1997. Bilan de 717 souches de *salmonella* isolées en milieu hospitalier dakarais. Bull Soc Méd. Afr Nre Glue Frse; 22: 65-71.
- 4- **CAQUET R**, 1994. Guide pratique des examens de laboratoire. 6<sup>ème</sup> Edition, Paris : 122-3.
- 5- **ALLOUCH PY, LABIA R, PINA P. et col**, 1995. Observations hospitalières de la sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* à l'association amoxicilline- acide clavulanique en 1994. Méd. Mal Infect ; 25 : 934-9.
- 6- **BOUKADIDA J., MONASTIRI K., LAMOURI N. et Coll.**  
Aspects épidémiologiques de la résistance des entérobactéries aux Céphalosporines de troisième génération en Tunisie centrale (Etude rétrospective sur 3 ans).
- 7- **APPIT**, 1996. Bactériémie, Sepsis et Choc septique, 15<sup>ème</sup> édition. E. PILLY, Montmorency: 2M2 : 19-25.
- 8- **VANDEPITTE J, VERHAEGEN J, et Coll**, 2003. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Heath Organisation. Geneva. Edition: 20-120.
- 9- **GOULON M**, 1985. Etat de choc et réanimation cardio-vasculaire. Abrégés de réanimation Médicale, Masson, Paris, : 194-204.

- 10- CONTREPOIS A.** 1995. Naissance de l'hémoculture. Rev Prat; **45** : 942-7.
- 11- LOULERGUE J, AVRIL JL, OMWANGA D,** 1987. Etude des produits pathologiques : Hémocultures. Editions SIMEP, 41-5.
- 12- DICTIONNAIRE ENCYCLOPEDIQUE, 2005.** Editions Philippe Auzou, Paris : 767.
- 13- KAMOUN P, FREJAVILLE JP.** Guide des examens de laboratoire, 3ème édition. Médecine Sciences Flammarion : 473-505.
- 14- LE MINOR L, MICHEL V.** 1989. Bactériologie Médicale. 2<sup>ème</sup> Edition Paris: 396- 795.
- 15- LODA FA, COLLIER, GLEREN WP, STRANGER K and all, 1975.** Occurrence of diplodocus pneumonie in the upper respiratory tract of children. J pediatr : 1087-93.
- 16- AVRIL JL, DABERNAT H, DENIS F, MONTEIL H.** Bactériologie clinique 3eme édition : 6-60.
- 17- SINGLETON P, SAINSBURY D,** 1984. Bactériologie. Paris, Masson : 158.
- 18- GASTINEL P,** 1954. Précis de bactériologie médicale. Paris, Masson : 1244.
- 19- FLANDROIS JP,** 1997. Bactériologie Médicale. Edition Presses Universitaires de Lyon : 107-99.
- 20- FAUCHERE JL, AVRIL JL, 2002.** Bactériologie générale et médicale Ellipses Edition marketing S.A : 236-8.
- 21- BERCHE P,** 1988. Les salmonelles. In : BERCHE P, GAILLARD JL, SIMONET M, eds. Bactériologie : les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion : 77- 90.

- 22- **FLEURETTE J**, 1989. Staphylocoques et Microcoques. In : LE MINOR L et VERON M, eds. Bactériologie Médicale, Paris : Flammarion, 1989 : 773 – 94.
- 23- **BERCHE P**, 1989. *Pseudomonas aeruginosa* et espèces voisines. In BERCHE P, GAILLARD J L et SIMONET M, eds. Bactériologie : les bactéries des infections humaines. Paris : Flammarion : 230-39.
- 24- « [http://fr.wikipedia.org/wiki/Gram\\_positif](http://fr.wikipedia.org/wiki/Gram_positif) ».consulté le 25 Mai 2009.
- 25- **BECTON, DICKINSON** and Company, 2004. BACTEC® 9050 Manuel d'utilisation. MA- 0103. Révision : E Réf 445845.
- 26- Bio Mérieux B.V. Bactériologie Mars 2003. Réf. 247003
- 27- **BECTON Dickinson**, 1996. Division DIAGNOSTIC VOTRE PARTENAIRE EN MICROBIOLOGIE : 1-4.
- 28- **OUOLOGUEM Y**. 2008. Bilan de deux années d'hémoculture au laboratoire de biologie médicale du point – G .Bamako : FMPOS, Thèse de Pharm. N° (08-P-93).
- 29- **SIDIBE M**, 2000. Bilan de six années d'hémocultures au laboratoire de l'Hôpital national du point G. Thèse Pharm. Bamako N° (00-P-4).
- 30- **SAMAKE M**, 2004. Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyse médicale de l'Hôpital Gabriel TOURE : aspect méthodologique. Thèse Pharm. Bamako N° (04-P-6).
- 31- **SOUDE SENA GBENOU-ABEBOLA AM**, 2005. Bactéries isolées des hémocultures au centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga de Cotonou, N° (05-P-84).
- 32- **MAIGA II, SIDIBE M, MAIGA A et ROCHEREAU A**. 2004. Les bactéries isolées par hémocultures à l'hôpital du G. Mali Méd. ; **19** (1) : 18- 23.
- 33- **ANAGONOU SY, AKPONA S, JOSSE R, MASSOUGBODJE A et coll**, 1993. Les isolements des bactéries dans les hémocultures au laboratoire de

bactériologie du .C.N.H.U-Cotonou (1987-1990). Médecine d'Afrique noire : 40(10) : 614-9.

**34- DIDJA M**, 1980. Les isolements de bactéries dans les hémocultures à l'Hôpital d'enfants Albert Royer (H.E.A.R) du CHU de Fann : à propos de 1629 flacons étudiés sur une période de cinq ans. Thèse Pharm., Dakar, N° (80-P-20).

**35- GOULET V**, 1985. Etude du relevé de bactéries isolées dans les hémocultures et les liquides céphalo-rachidiens par les laboratoires d'hôpitaux publics français en 1983. Med Mal Infect ; **15** : 342-50.

**36- DOSSO M, FAYE H, AISSI H SYLLA DF, EHOUNOUD H et KOTCHI R**, 1988. Les hémocultures au CHU d'Abidjan (Cote d'Ivoire) de 1982 à 1986. Publications Méd. Afr ; (90) : 17-21.

**37- DJOFFON**, 1980. Bilan des prélèvements bactériens en milieu hospitalier universitaire dakarois de 1972 à 1979 : Etude de 19 000 souches. Thèse Méd. Dakar, N° (80-P-33).

**38- GRE TL**, 1984. 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 Méd. N° (84-P-502).

**39- GORO D**, 2002. 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 Pharm. Bamako, N° (02-P-50).

**40-YARRO F**, 2000. Septicémies : place des virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans le service de médecine interne de l'hôpital national du point G. Thèse Méd. Bamako, N° (00-M-10).

**41- BAUDAT V.** d'Arnex-sur-Orbe, 2002. "Hémocultures positives à l'Hôpital Cantonal de Fribourg, 1997-1998 : signification clinique, microbiologie, épidémiologie, traitement et pronostic". Lausanne. :10248: 06-09.

**42- BERGOGNE, BEREZIN E, DELLAMONICA P**, 1995. Antibiothérapie en pratique clinique ; Paris, Masson : 486.

- 43- DUVAL J, SOUSSY CJ, 1990.** Antibiothérapie, 4eme édition, Paris, Masson : 188.
- 44- JUPPEAU-VESSIERES AM, SCAVISSI MR, 1994.** Evolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Editions techniques. Encycl. Méd. Chir (Paris, France), Maladies infectieuses. 8-006-0-10 : 16.
- 45- STAHL JP, MOUTON Y, MICOU M** et groupe S.E.S, Système expert et épidémiologie des septicémies. Premières Journées de l'hémoculture, Paris : 26-27 février 1988.
- 46- DUVAL J, 1989.** Evolution des résistances In : LE MINOR L, VERON M, eds. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion.
- 47- PODIE MAGNE NK, 1999.** Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des germes les plus fréquemment isolés au laboratoire de bactériologie du CNHU de Cotonou (à propos de 896 souches bactériennes isolées du 1<sup>er</sup> mars au 30 Juin 1999). Thèse Méd. Cotonou, N° (99-M-853).