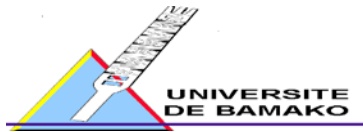


Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique



République du Mali

Un Peuple - Un But - Une Foi



Faculté de Médecine de Pharmacie et d'OdontoStomatologie

Année universitaire 2009-2010.

N°...../

TITRE

**FREQUENCE D'ISOLEMENT DES
KLEBSIELLA AU LABORATOIRE DE
BACTERIOLOGIE CVD DU CHU GABRIEL
TOURE DE 2002 A 2007.**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le ___/___/2010 devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto - Stomatologie

Par Mme KONE Koumba DIALLO

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

Jury:

Président :	Pr. Daouda K	MINTA
Membres :	Dr. Broulaye	TRAORE
	Dr. Samba A	SANGARE
Co-directeur :	Dr. Souleymane	DIALLO
Directeur:	Pr. Flabou	BOUGOUDOGO

DEDICACES

Je rends grâce :

- **A l'éternel, le Tout Puissant (ALLAH)**

A lui tout ce qui est dans les cieux et sur terre. Nul ne peut intercéder auprès de lui, qu'avec sa permission, il est le très haut et le très miséricordieux.

Je te rends grâce pour les bienfaits dont tu m'as comblé jusqu'à présent et te prie de m'en accorder de nouveaux qui correspondent aux besoins de mon évolution.

Me voici à la croisée des chemins, c'est par ta volonté que tout se dessine et se réalise.

Puisse la conscience cosmique continuer à m'inspirer afin que je sois le digne instrument de tes desseins. Amen.

- **Au Prophète Mohamed (Paix et salut sur lui)**
- **A mon père : feu Seydou DIALLO (in memorium)**

Ma source d'inspiration unique, j'aurais voulu passer ces moments avec toi mais le Tout Puissant en a décidé autrement. C'est d'ailleurs pour ces raisons que tu es devenu l'un des plus grands artisans de ma réussite scolaire et universitaire.

Saches que ta place dans mon cœur et ma pensée, restera et demeurera immense.

Que la terre te soit légère,
Que ton âme soit bénite,
Que le Tout Puissant t'accueille dans son paradis. Amen.

- **A ma mère** : feu Assan DIALLO (in memorium)

La perle de mon existence, Quelle brave dame que tu étais, que de sacrifices consentis à mon égard afin que je progresse dans mes études. Je tombe en admiration devant la bonté de ton cœur à nulle pareille.

Quels que soient mes caprices et mes écarts tu m'as toujours soutenu, trouvant les mots justes pour me ramener sur le bon chemin.

L'évènement que nous célébrons aujourd'hui t'est entièrement dédié.

Puisse le seigneur t'accorder sa miséricorde. Amen !

- **A mes frères et sœurs** : Diakaridia, Souleymane, Mama et Oumou .K .
DIALLO

Que ces modestes lignes vous servent de témoignage de mon attachement indéfectible au lien sacré de la famille

- **A mon fils Seydou M. KONE** : ta venue au monde est la plus belle chose qui me soit arrivée. Je t'aime de tout mon cœur.
- **A mes oncles et tontons** :

Chacun de vous a eu à jouer un rôle dans ma vie. Puisse à cet instant, chacun de vous recevoir le fruit de ses intentions.

Particulièrement : Sitafa DIALLO et Niania Youssouf DIALLO

La mémoire de mon oncle feu Saydou SACKO :tu m'as enseigné les vertus de l'honneur, de la dignité et le sens du travail bien fait. Puisse Allah t'accorder sa miséricorde.

- **A mes tantes** : Fatoumata TOGOLA et Fadima TALL

Trouvez en ce document le fruit de vos encouragements et de votre attachement.

Particulièrement à ma tante N'Bene DIALLO ma mère adoptive :tu m'a accordé ton amour inconditionnel .Ceci est la consécration de tous tes efforts. Puisse Dieu t'accorder une longue vie. Amen !

- **A mes cousins et cousines** : Mama DIALLO, Fatoumata N. DIALLO, Cheick O. DIALLO, Mohamed DIALLO, Alima DIALLO et Angeline pour leur soutien moral.

Particulièrement à Aminata DIALLO dite Mama : Qu'aurais-je pu faire sans toi ? J'ai trouvé auprès de toi un appui sans faille.

Je te dois de vraies années de bonheur.

- **A mes amis (es)** : Ouassa DEMBELE, BERTE, Nana DAOU, Awa Salimou COULIBALY, Anna N'DIAYE et Akatore ADJO, Fatoumata BALLO dite Bato, Fatim DIALLO, Fatim CISSE, Assetou DIALLO, Fatoumata BAKHAGA, Mariam S TRAORE.
- **A ma belle famille** : la famille KONE.

Particulièrement mon mari Mahamoutou KONE pour ton aide ton affection, ta compréhension, tes encouragements et ton amour sans faille; trouve ici l'expression de mon profond amour et de mon éternelle reconnaissance.

REMERCIEMENTS

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

Principalement :

- **A tous mes maîtres** de l'enseignement primaire, secondaire et universitaire qui m'ont transmis leurs savoirs et leurs connaissances pendant mon parcours scolaire et universitaire.
- **A mes amis (es)** pour leur sympathie.
- **A mes nièces** en témoignage d'une longue vie.
- **A mes camarades de la FMPOS**
- **A mes voisins** pour leur relation de bon voisinage.
- **A tout le personnel du laboratoire du CHU Gabriel TOURE** particulièrement au **Dr Samba Adama SANGARE** et **Cheick F. M. DIABATE** pour leur accueil, leur aide et leur sympathie qui ont été des atouts précieux tout au long de ce parcours.
- **A tout le personnel de la bibliothèque de la faculté de médecine** pour leur aide.
- **A nos aînés du service** pour leur disponibilité et leur conseil précieux.
- **A nos cadets du service** pour leur respect à mon égard.
- **A ceux de ma promotion au service** pour leur esprit d'équipe et leur sympathie.
- **A mes patients** pour leurs bénédictions.

Enfin, je reformule mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail elles sont si nombreuses pour que j'en fasse une liste nominative.

HOMMAGES

A notre Maître et Président du jury

Professeur Daouda K. MINTA

- **Maître de Conférences, Agrégé,**
- **Agrégé de maladies infectieuses et tropicales,**
- **Diplômé de Parasitologie, Mycologie,**
- **Titulaire de Master de Sciences Biologiques,**
- **Chef de service de Maladies Infectieuses et Tropicales.**

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre simplicité et votre modestie font de vous un homme admirable. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail et vos qualités d'homme de science, de culture, de chercheur aguerri font de vous un exemple à suivre. Veuillez accepter cher maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

HOMMAGES

A notre Maître et Juge

Docteur Broulaye TRAORE

- **Chef de service de la pédiatrie du CHU Gabriel TOURE,**
- **Président de l'AMALDEME (Association Malienne de lutte contre les Déficiences Mentales chez l'Enfant),**
- **Chargé des cours de Pédiatrie à l'INFSS (Institut de Formation en Science de la santé) de Bamako.**

Cher maître

Malgré vos innombrables occupations vous nous avez honneur en acceptant de siéger dans ce jury. Vos qualités d'homme simple et aimable ne laissent jamais indifférentes.

Soyez rassuré de nos sincères remerciements.

HOMMAGES

A notre Maître et juge

Docteur Samba Adama SANGARE

- **Pharmacien, chercheur au CVD- Mali (Centre pour le Développement des vaccins- Mali).**
- **Assistant en Bactériologie et virologie à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odonto- Stomatologie (FMPOS).**

Vous nous avez fait honneur d'accepter de faire partie de ce jury.

Nous sommes très honorés de pouvoir bénéficier de votre apport pour l'amélioration de la qualité de cette thèse.

Votre simplicité, votre courtoisie et votre disponibilité font de vous un homme d'exception.

Veillez recevoir ici l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

Que Dieu vous garde. Amen !

HOMMAGES

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Docteur Souleymane DIALLO

- **Pharmacien biologiste, Colonel des forces armées du Mali,**
- **Chef de service du laboratoire d'Analyses Médicales du CHU Gabriel TOURE,**
- **Maître Assistant en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie.**

Cher maître

Nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots me manquent pour vous exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Votre simplicité, votre compétence et surtout votre rigueur scientifique sont les atouts qui nous ont fasciné, dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail qui est également le votre.

HOMMAGES

A notre Maître et Directeur de thèse

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

- **Maître de conférences agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,**
- **Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique,**
- **Responsable des cours de bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,**
- **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé.**

Cher maître

Vous nous avez fait honneur en acceptant la réalisation de cette thèse dans le service de laboratoire d'Analyses Médicales du CHU Gabriel TOURE. En plus du statut de chercheur confirmé et aguerri, nous avons vite apprécié vos immenses qualités humaines et scientifiques. Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître respecté et admiré de tous.

Soyez rassuré, cher maître de notre sincère admiration et de notre profonde gratitude.

Liste des sigles et abréviations

- **ADH** : Arginine-Dihydrolase ;
- **API** : Analytic Profil Index ;
- **BGN** : Bacille Gram Négatif ;
- **BGP** : Bacille Gram Positif ;
- **CHU** : Centre Hospitalier Universitaire.
- **Cocco BGN** : Cocco Bacille Gram Négatif ;
- **CGPch** : Cocci Gram Positif en Chaine ;
- **CGPgr** : Cocci Gram Positif en Grappe ;
- **CGPpr** : Cocci Gram Positif en Paire ;
- **CVD** : Center for Vaccine Development ;
- **DCGN** : Diplocoque Gram Négatif ;
- **LDC** : Lysine-Décarboxylase ;
- **ODC** : Ornithine- Décarboxylase ;
- **ONPG** : Orthonitrophényl-B-D- Gelactopyranoside ;
- **RM** : Rouge de Méthyle ;
- **TDA** : Thytoplane- Desaminase ;
- **TTR** : Tetrathionate- Reductase ;
- **VP** : Voges-Proskauer ;

- INTRODUCTION.....
- OBJECTIF GENERAL.....
- OBJECTIFS SPECIFIQUES.....
- 2. GENERALITES SUR LE GENRE *KLEBSIELLA*.....
- 2.1. Dénomination.....
- 2.2. Classification et écologie.....
- 2.3. Caractères bactériologiques.....
- 2.3.1. Morphologie.....
- 2.3.2. Caractères cultureux.....
- 2.3.3. Caractères biochimiques.....
- 2.3.3.1. Caractères biochimiques de l'espèce- type de *Klebsiella pneumoniae*.....
- 2.3.3.2. Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre *Klebsiella*....
- 2.3.3.3. Caractères différentiels de *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*.....
- 2.3.3.4. Schéma de biotypes de *Klebsiella*
- 2.3.4. Caractères antigéniques.....
- 2.4. Génétique
- 2.5. Physiopathologie.....
- 2.5.1. Facteurs de virulence.....
- 2.5.2. Pouvoir pathogène naturel.....
- 2.5.3. Pouvoir pathogène expérimental
- 2.6. Contrôle de l'infection
- 2.6.1. Epidémiologie
- 2.6.2. Traitement.....
- 2.7. Rôle des *Klebsiella* et autres entérobactéries dans les infections nosocomiales.....
- 2.7.1. Ecologie.....
- 2.7. 2. Pathogénie.....
- 2.7.3. Epidémiologie et prévention des infections nosocomiales.....
- 3. METHODOLOGIE.....
- 3.1. Le Cadre d'étude.....
- 3.2. L'étude.....
- 3.2.1. Type d'étude.....

- **3.2.2. Durée de l'étude**.....
- **Critères d'Eligibilité**
- **3.2.3.1. Critères d'inclusion**.....
- **3.2.3.2. Critères de non- inclusion**.....
- **3.3. Aspects éthiques de l'étude**
- **3.3.1. Consentement des malades**.....
- **3.3.2. Respect des références bibliographiques**.....
- **3.4. La réception des prélèvements au laboratoire**.....
- **3.5. Présentation de la méthode d'hémoculture**.....
- **3.6. Protocole de techniques des hémocultures positives**.....
- **3.7. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques**.....
- **3.7.1. Traitement des prélèvements de LCR**.....
- **3.7.2. Protocole de travail de la Culture du LCR**.....
- **3.8. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries**.....
- **3.8.1. Coloration de Gram**.....
- **3.9. Tests biochimiques et métaboliques**.....
- **3.9.1. Oxydase**.....
- **3.9.2. Galeries classiques pour entérobactéries**.....
- **3.9.2.1. Test à l'ONPG**.....
- **3.9.2.2. Recherche de l'uréase**.....
- **3.9.2.3. Recherche de l'indole**.....
- **3.9.2.4. Recherche du thiosulfate- réductase (production de H₂S)**.....
- **3.9.2.5. Réaction de Voges- Proskauer**.....
- **3.9.2.6. Milieu synthétique au citrate de Simmons**.....
- **3.9.2.7. Recherche des décarboxylases et dihydrolase (LDC, ODC, ADH)**.....
- **3.10. Galerie API 20E**.....
- **3.11. Test de Sensibilité des antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer**.....
- **3.12. Conservation des cultures pures**.....
- **4. PRESENTATION DES RESULTATS**.....
- **4.1. Résultats globaux**.....

- **4.2. Présentation des résultats sociodémographiques.....**
- **4.3. Etude bactériologique des prélèvements.....**

Fréquence des germes isolés.....

4.3.2. Profil antibiotique des espèces de Klebsiella isolées.....

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS.....

6- CONCLUSION.....

7- RECOMMANDATIONS.....

7.1. Aux personnels socio-sanitaires.....

7.2. Aux autorités.....

7.3. A la population.....

8- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....

- **9- ANNEXES.....**

1. INTRODUCTION :

Les infections microbiennes occupent actuellement la première place dans les pathologies médicales. Malgré les efforts déployés pour endiguer ce fléau, les maladies infectieuses continuent de poser d'énormes problèmes de santé publique. [1].

Les infecti

ons à Klebsiella sont généralement des infections nosocomiales suite à des actes chirurgicaux lourds, de la pose de cathéter, de dialyse. Elles surviennent surtout chez les débilisés (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons.). Les septicémies à Klebsiella sont de pronostic sévère. [2].

Les Klebsiella sont des bactéries très répandues dans la nature (l'eau, le sol, les végétaux, la flore fécale des animaux), sur la peau, les muqueuses et surtout les voies respiratoires supérieures de l'homme provoquant ainsi des pneumonies mortelles c'est pourquoi Friedlander les a appelé pneumobacille. [3].

Les Klebsiella provoquent aussi des infections urinaires, biliaire et des épidémies de gastro-entérite infantile chez l'homme. Mais aussi chez les animaux, on les isole d'infections diverses notamment des mastites des bovidés, de métrite des juments. [2].

Bien qu'étant une bactérie commensale de l'homme ; Klebsiella fait partie des bactéries multi résistantes. [4].

Elle résiste à la majorité des antibiotiques utilisés et rend ainsi difficile le traitement.

Ceci pose un problème de santé publique car la population touchée est fragile (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons), surtout avec la problématique du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Selon l'OMS le nombre de personne vivant avec le VIH s'élève à 33,4 millions, 2 millions de personnes sont décédées. Les maladies associées au sida restent une première cause

dans le monde et devraient en outre continuer d'être dans les prochaines décennies, un facteur significatif au plan mondial de la mortalité précoce (Organisation Mondiale de la Santé 2008). C'est pourquoi nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

OBJECTIF GENERAL :

Etudier la fréquence d'isolement des Klebsiella au laboratoire de bactériologie CVD -MALI du CHU Gabriel TOURE.

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- 1- Déterminer la fréquence d'isolement des Klebsiella au sein du laboratoire de bactériologie CVD -MALI du CHU Gabriel TOURE.
- 2- Déterminer les caractéristiques socio- démographiques des patients atteints d'infection à Klebsiella au service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE.
- 3- Déterminer le devenir immédiat des patients.
- 4- Dégager le profil antibiotique du genre Klebsiella.
- 5- Déterminer la place de Klebsiella dans les infections nosocomiales.

2. GENERALITES SUR LE GENRE *KLEBSIELLA* :

2.1. Dénomination :

Le nom Klebsiella provient du nom du bactériologiste Klebs, 1877 et l'espèce type dénommée « pneumobacille » par Friedlander qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882- 1884. [5].

2.2. Classification et écologie :

On distingue sept espèces : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornitholytica*. [6].

Klebsiella pneumoniae et *Klebsiella oxytoca* sont répandues dans la nature, on peut les isoler de l'eau, de végétaux, d'aliments divers. Ces deux espèces sont rencontrées dans la flore fécale de 30 à 40 pour 100 des animaux sauvages ou domestiques et de l'homme ; elles végètent sur la peau, les muqueuses et les voies respiratoires supérieures. *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* ne sont pratiquement isolées que de l'arbre respiratoire de l'homme. [3].

Le portage digestif de Klebsiella est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale. Sur les mains du personnel et sur les objets de l'environnement dans les services hospitaliers, la présence de Klebsiella est très fréquente. La transmission des Klebsiella d'un malade à l'autre est habituellement manuelle. Des épidémies hospitalières dues à des souches multirésistantes peuvent être observées. [6].

Deux nouvelles espèces de Klebsiella, phénétiquement proches de *Klebsiella pneumoniae* mais appartenant à des groupes d'homologie de l'ADN distincts, ont été individualisées en 1981 : *Klebsiella planticola* (syn. *Klebsiella trevisanii*) et *Klebsiella terrigena*. On les trouve dans les eaux de surface, les eaux usées, les effluents industriels (papeteries scieries, minoteries) le sol, les végétaux,

les aliments, mais elles ne sont qu'exceptionnellement isolées chez l'homme et les animaux.

Enterobacter aerogenes s'apparente avec l'ensemble de ses caractères phénétiques et génomiques à *Klebsiella pneumoniae*, si bien que certains bactériologistes l'ont dénommé *Klebsiella mobilis*. Les deux appellations : *Enterobacter aerogenes* et *Klebsiella mobilis* sont légales et la même souche-type leur est assignée. [3].

2.3. Caractères bactériologiques :

2.3.1. Morphologie :

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif (coloration bipolaire fréquente), toujours immobiles, de dimensions comparables à celles de *Escherichia coli*, très souvent encapsulés. Cette capsule de nature polysaccharidique contient des acides hexuroniques (acides glycuronique et galacturonique), et de 2 à 4 sucres (galactose, glucose, mannose, fucose, rhamnose). La taille des capsules va en croissant de *Klebsiella oxytoca* (20 à 25p.100 de souches non capsulées) à *Klebsiella pneumoniae* (5p.100 environ de souches non capsulées), et surtout à *Klebsiella ozaenae* et *Klebsiella rhinoscleromatis* qui possèdent de volumineuses capsules. La culture sur milieu sucré, tel que le milieu hypersaccharosé de Worfel-Ferguson favorise la formation de capsules ; au contraire, l'évolution vers des formes non capsulées peut être obtenue par croissance en bouillon bilié à 50p.100. [2].

Les *Klebsiella* ont un poids moléculaire d'environ 3,36.10⁹ daltons. [7].

2.3.2. Caractères cultureux :

Sur les milieux classiques d'isolement pour entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey), les colonies de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont lactoses positives, bombées, muqueuses, parfois filantes à l'anse de platine, d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 - 24 h à 37°C. La croissance de *Klebsiella ozaenae*

et *Klebsiella rhinoscleromatis* sur les mêmes milieux est quelquefois plus lente (48 h), leurs colonies sont alors volumineuses, bombées, muqueuses, translucides, avec tendance à la confluence.

Des milieux sélectifs ont été proposés pour l'isolement des *Klebsiella* lors d'épidémies hospitalières ou pour la numération de leurs colonies en bactériologie alimentaire : milieu « MacConkey- inositol- carbénicilline » (croissance possible des *Serratia*), milieu synthétique de Bruce et coll. Au citrate- L- ornithine- raffinose- rouge de phénol, pH 5,6, milieu synthétique de Wong et coll. Au lactose-KNO₃- rouge neutre- cristal violet, milieu synthétique de Van Kregten et coll. au citrate- inositol.

En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30° et 37°C pour *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* avec parfois dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface. A 10°C, seules se développent *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* et 60 p. 100 des souches de *Klebsiella oxytoca*.

A la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90 p.100 des souches de *Klebsiella pneumoniae* croissent à 44°C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80 p. 100 en fermentant le lactose avec production de gaz (test des « coliformes fécaux » positif).

2.3.3. Caractères biochimiques :

2.3.3.1. Caractères biochimiques de l'espèce- type de *Klebsiella pneumoniae* :

Klebsiella pneumoniae peut être définie comme une Entérobactérie immobile, VP +, RM -, uréase + lentement (uréase moins active que celle des *Proteus*), ONPG +, β-xylosidase +, H₂S -, indole -, désaminase oxydative -, LDC +, ODC -, lipase, DNase et gélatinase -, KCN +, fermentant de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate.

2.3.3.2. Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre *Klebsiella* :

Klebsiella oxytoca se différencie de *Klebsiella pneumoniae* par la production constante d'indole ; environ 80 pour 100 des souches possèdent de plus une gélatinase d'activité modérée, 20 pour 100 une TTR. Toutes les souches de *Klebsiella oxytoca* fermentent le sorbose.

Klebsiella ozaenae et *Klebsiella rhinoscleromatis*, outre le caractère VP -, sont moins glucidolytiques que les deux espèces précédentes. *Klebsiella ozaenae* n'utilise jamais le malonate. *Klebsiella rhinoscleromatis* est caractérisée par une stricte auxotrophie, l'absence de production de gaz et une activité biochimique réduite.

2.3.3.3. Caractères différentiels de *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena* :

Espèces psychrophiles de l'environnement, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* sont indiqués dans le tableau 17-XI.

2.3.3.4. Schéma de biotypes de *Klebsiella* :

Dans le genre ***Klebsiella***, les fermentations du dulcitol, du sorbose, le catabolisme du d- tartrate, secondairement les fermentations du rhamnose et de l'adonitol permettent de définir des biotypes (tableau 17-XII). Ces biotypes peuvent servir de marqueurs épidémiologiques.

Variétés uréase négative (uréase -) de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*

Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* et de *Klebsiella oxytoca* peuvent paraître « uréase - » après 24 heures à 37°C si on utilise des cultures sur gélose nutritive et un milieu réactif à l'urée du type Ferguson (par exemple, milieu « urée-indole »). Chez plus de la moitié de ces souches, l'uréase peut être mise en évidence en quelques heures, lorsqu'elles ont été cultivées sur des milieux contenant des sucres fermentescibles (milieu de Hajna ou milieu hypersaccharosé de Worfel-Ferguson) : la fermentation des glucides, en acidifiant les milieux de culture,

favorise la synthèse de l'uréase par les Klebsiella. L'autre moitié de ces souches, effectivement dépourvues d'uréase, acidifie pour une raison inconnue le milieu « urée-indole », dont l'indicateur vire au jaune citrin.

2.3.4. Caractères antigéniques :

Les Klebsiella possèdent des antigènes O (somatiques), et K (capsulaires).

La recherche des antigènes O présente peu d'intérêt pratique, en raison de leur nombre réduit (13 antigènes O différents) et de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires K.

La recherche des antigènes K est indispensable à toute enquête épidémiologique. Ils sont recherchés par agglutination sur lame ou en tubes, ou encore par la réaction de Neufeld dite du « gonflement » de la capsule (opacification de la capsule résultant d'une réaction antigène-anticorps) (fig. 17-8b-c). Le typage antigénique capsulaire peut aussi être effectué par immunofluorescence indirecte à pH 9, par immunoelectrophorèse à contre courant, par coagglutination de la souche de Cowan de *Staphylococcus aureus* enrobée d'anticorps anticapsulaire, par agglutination de particules de latex sensibilisées.

Il existe 77 types capsulaires, soit K1 à K72, K74, K79 à 82. *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* se distribuent selon un grand nombre de type capsulaire.

Klebsiella ozaenae appartient généralement au type 4, plus rarement aux types 1, 5, 6, 22. *Klebsiella rhinoscleromatis* uniquement au type 3.

Il existe des communautés antigéniques K entre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries quand elles sont capsulées. [2].

2.4. Génétique :

Certaines souches de *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* hébergent des plasmides qui possèdent des gènes (nif) qui leur permettent de fixer l'azote atmosphérique. Ces plasmides peuvent être transférés à *Escherichia coli* K12.

2.5. Physiopathologie :

2.5.1. Facteurs de virulence :

La taille des capsules et leur spécificité (type antigénique capsulaire) sont des facteurs de pathogénicité. Les capsules protègent les bactéries contre la phagocytose, contre l'action bactéricide du sérum ; elles s'opposent à la pénétration des antibiotiques.

La virulence pour la souris est corrélée avec la présence d'un plasmide portant le gène codant pour le sidérophore aérobactine et le récepteur du complexe fer ferrique-aérobactine.

Les pili (fimbriae), grâce à leur propriété d'adhésion, jouent eux aussi un rôle dans la pathogénèse des affections urinaires.

Il possède une endotoxine comme avec *Escherichia coli*. [8].

2.5.2. Pouvoir pathogène naturel :

Klebsiella pneumoniae et *Klebsiella oxytoca* sont principalement isolées chez l'homme de bronchopneumopathies, aiguës et subaiguës (en particulier *Klebsiella pneumoniae* types capsulaires 1 et 2) et d'infections urinaires, secondairement d'infections hépatovésiculaires, de pus divers, d'infections péritonéales post-opératoires. Les septicémies à *Klebsiella* sont de pronostic sévère ; elles surviennent chez des malades débilisés (cancéreux, cirrhotiques, diabétiques, vieillards et nourrissons) ; elles ont souvent pour point de départ une infection urinaire (cas le plus fréquent), respiratoire ou biliaire. L'infection par *Klebsiella* peut survenir à la

suite d'une dialyse péritonéale ou de la pose d'un cathéter. Le rôle pathogène de *Klebsiella pneumoniae* dans l'étiologie de quelques épidémies de gastro-entérite infantile a pu être évoqué lorsque la flore des selles diarrhéique était, avant tout traitement, composée à plus de 80% de *Klebsiella pneumoniae* appartenant chez tous les malades au même type capsulaire ; ce rôle est cependant controversé.

Chez les animaux, on les isole d'infections diverses : mastite des bovidés, métrite des juments due en particulier aux types capsulaires K1, K2 et K30, qui seraient responsables d'avortement.

Klebsiella ozaenae n'est retrouvée pratiquement que dans les prélèvements rhinopharyngés. On n'a, toutefois, pas de preuve qu'elle est l'agent étiologique de l'ozène.

Klebsiella rhinoscleromatis, isolé du même type de prélèvement chez des malades provenant d'Afrique du Nord, d'Afrique Centrale et de l'Est européen, possède un pouvoir pathogène comparable à celui de *Klebsiella ozaenae*. Ces deux espèces sont strictement adaptées à l'homme.

2.5.3. Pouvoir pathogène expérimental :

Seul *Klebsiella pneumoniae* de type capsulaire 1 et 2 sont pathogène pour l'animal : souris par voie intrapéritonéale (DL₅₀ : 10 bactéries, pour les souches les plus pathogènes), rat par instillation intranasale ou par aérosol, singe « écureuil » *Saimiri sciureus* inoculé par voie intra-trachéale. *Klebsiella ozaenae* type capsulaire 4 est pathogène pour la souris par voie intrapéritoniale (DL₅₀ : 500 bactéries).

2.6. Contrôle de l'infection :

2.6.1. Epidémiologie :

Les types antigéniques capsulaires et les biovars sont des marqueurs épidémiologiques les plus employés ; leur combinaison permet de définir des « variétés » de Klebsiella. Les profils de résistance aux antibiotiques peuvent être utilisés ; les phagovars et les colicinovars sont moins souvent recherchés. Les enquêtes menées en milieu hospitalier ont montré que le génie épidémique des Klebsiella est limité. Il est habituel que dans un même service plusieurs variétés de Klebsiella coexistent. L'existence de flambée épidémique à Klebsiella est exclue, celle de petits foyers est possible.

2.6.2. Traitement :

La plupart des souches produisent des pénicillinases .En effet les Klebsiella possèdent une résistance naturelle à l'ampicilline et à la carbénicilline (chez les nouveau-nés et nourrissons soumis à un traitement à l'ampicilline, le nombre des *Escherichia coli* diminue dans les selles, celui des Klebsiella et *Enterobacter cloacae* augmente) mais elles restent en général sensibles aux céphalosporines. Parmi les antibiotiques les plus actifs, on peut citer la colistine, l'acide nalidixique et les dérivés du furane (infections urinaires), l'association triméthoprim-sulfaméthoxazole, certains aminosides (gentamicine), les quinolones, les céphalosporines de troisième génération ou la ticarcilline convenablement choisis. Des vaccins associant plusieurs polysaccharides capsulaires ou constitués du polysaccharide K1, exempt de lipopolysaccharide ont été préparés. [2]. La prophylaxie repose sur les mesures de prévention des infections nosocomiales et idéalement l'éradication des réservoirs hospitaliers. [8].

2.7. Rôle des Klebsiella et autres entérobactéries dans les infections

nosocomiales :

2.7.1. Ecologie :

D'une façon générale, ces entérobactéries liées à l'hospitalisme sont présentes dans la nature en particulier dans le tube digestif et les cavités naturelles des animaux et de l'homme. Il existe aussi des bactéries du même type dans l'environnement où elles peuvent proliférer sur des zones riches en humus ou en débris végétaux. D'un point de vue médical, les habitats les plus importants de ces entérobactéries sont les services où a lieu une activité médicale lourde et complexe (réanimation, chirurgie, urologie, etc.).

<i>Escherichia</i> (H)	<i>Shigella</i>		
<i>Klebsiella</i> (H)	<i>Enterobacter</i> (H)	<i>Hafnia</i>	<i>Serratia</i> (H)
<i>Proteus</i>	<i>Morganella</i> (H)	<i>Providencia</i> (H)	
<i>Salmonella</i>			
<i>Citrobacter</i> (H)			
<i>Yersinia</i>			

Tableau 1 : Les entérobactéries fréquemment observées en clinique.

Les bactéries plutôt responsables d'infections en milieu hospitalier sont notées (H). *Escherichia coli* est à la fois fréquent chez des sujets suivis en médecine de proximité et en milieu hospitalier. Les *Hafnia* sont rares.

2.7. 2. Pathogénie :

Les tableaux infectieux sont essentiellement des tableaux en liaison avec l'activité de soin. On observe ainsi des infections urinaires dues à la prescription et à la mise en place de sonde urinaires dans de mauvaises conditions d'hygiène. De même, les

septicémies dues à la pose de cathéters sont particulièrement fréquentes. On connaît aussi les surinfections respiratoires des sujets soumis à une respiration artificielle et des surinfections extrêmement variées suivant des actes chirurgicaux. Certaines entérobactéries peuvent être responsables d'infections sans liaison avec l'hôpital. C'est le cas de *Klebsiella* qui est responsable d'infections pulmonaires (d'où le nom de *Klebsiella pneumoniae*).

Ces infections surviennent le plus souvent chez des sujets atteints de bronchite chronique mais *Klebsiella pneumoniae* est beaucoup moins fréquente que *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*. *Proteus mirabilis* est retrouvé aussi comme responsable d'infections urinaires en pratique de proximité.

2.7.3. Epidémiologie et prévention des infections nosocomiales :

Certaines entérobactéries sont responsables d'infections particulièrement bien caractérisées ; on les identifie à des bactéries pathogènes spécifiques. Ces bactéries ne se retrouvent pas à l'état commensal, à l'exception des suites d'infection, ni dans les milieux extérieurs où leur présence n'est que transitoire. D'autres entérobactéries appartenant à la flore digestive normale de l'Homme et des animaux peuvent devenir pathogènes dans certaines conditions. Ainsi, une intervention chirurgicale sur l'intestin peut contaminer les tissus et donner des infections secondaires à cette pratique chirurgicale ; l'utilisation large d'antibiotiques peut sélectionner certaines entérobactéries qui exprimeront dans ces conditions un pouvoir pathogène jusqu'alors beaucoup plus limité ; de nombreuses infections iatrogènes à entérobactéries sont dues à des défauts d'asepsie permettant la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade soit par les pratiques médicales ou chirurgicales, soit par le personnel (voie manuportée). Les entérobactéries sont donc des germes très importants de l'infection nosocomiale.

La prévention de l'infection à entérobactéries est différente selon qu'il s'agit d'entérobactéries pathogènes opportunistes, agents d'infections hospitalières, ou de bactéries pathogènes spécifiques. Dans le premier cas, la limitation des contaminations est obtenue par de bonnes pratiques d'hygiène, par l'isolement éventuel des patients porteurs et par une maîtrise de l'utilisation des antibiotiques. [9].

3. METHODOLOGIE :

3.1. Le Cadre d'étude :

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de l'Hôpital 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 jeune Soudanais stagiaire 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). Il 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 et 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 CO₂ pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO₂ 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 à 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 permettent de réaliser des activités de bactériologie.

Le personnel comprend :

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

3.2.1. Type d'étude :

Il s'agit d'une étude rétro- prospective portant sur des resultats bacteriologiques enregistrés sur cinq ans et une étude prospective longitudinale sur un an se rapportant aux resultats bacteriologiques de produits biologiques réalisé sur notre site d'étude. Après avoir obtenu un consentement éclairé ou assentiment, une hémoculture est réalisée chez chacun des enfants vu en ambulatoire ou hospitalisé dans le service de pédiatrie.

Dans certain cas et selon le contexte clinique un examen cyto bactériologique du liquide céphalo- rachidien ou de liquides stériles d'autres sites (lombaire, pleural, articulaire, tissulaire, cérébral et osseux) est réalisé.

3.2.2. Durée de l'étude :

L'étude a été réalisée sur une période de six ans : de 2002 à 2007, couvrant toutes les saisons y comprises : la saison fraîche, la saison sèche et la saison pluvieuse.

3.2.3. Critères d'Eligibilité :

3.2.3.1. Critères d'inclusion :

Les produits biologiques analysés venaient de sujets répondant aux critères suivants:

- Etre âgé de moins de 17 ans ;
- Etre hospitalisé dans le service de pédiatrie ou vu en ambulatoire du Centre Hospitalier Universitaire Gabriel TOURÉ ;
- 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.

3.2.3.2. 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 pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- L'incapacité ou refus du parent ou de l'accompagnateur du patient à donner un consentement.

3.3. Aspects éthiques de l'étude :

3.3.1. 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 consultation du service de Pédiatrie du CHU Gabriel TOURE pendant la durée de l'étude. Chaque pédiatre a à ses cotés un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusions, d'expliquer les modalités de l'étude, les objectifs, les risques et les bénéfices pour l'enfant à la famille et\ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion.

3.3.2. 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.

3.4. La réception des prélèvements(produits biologiques) au laboratoire

Les prélèvements(produits biologiques) étaient faits de :d' hémocultures, de LCR(Liquide Céphalo- Rachidien), de liquide articulaire, pleural, sous cutané ,péritonéal et musculaire, de pus et d'abcès cérébral.

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 l'enregistrement des autres prélèvements (liquide articulaire, liquide pleural, liquide sous cutané) ;

-1 registre pour la goutte épaisse ;

Chaque registre comprend :

-une partie des 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.

3.5. Présentation de la méthode d'hémoculture :

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 CO₂. Les microorganismes présents dans les bouteilles BACTEC® libèrent du CO₂ 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 CO₂ libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré- programmés. [10].

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®. [11].

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 2-5 ml de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans chaque flacon d'hémoculture qui est saisi 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). [12].



figure 1 : 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 courants 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®.

[13].



figure 2 : Le flacon BD BactecTM PEDS PLUS /F.

Le flacon BD BactecTM PEDS PLUS /F a été 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®.

Composition du bouillon BACTEC® 9050

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

Liste des composants :

(Les pourcentages correspondent au poids par rapport au volume)

Eau traitée	40 ml
Bouillon digéré de soja- caseine	2,75 %
Extrait de levure	0,25 %
Digestion de tissu animal	0,10 %
Pyruvate de sodium	0,10 %
Dextrose	0,06 %
Sucrose	0,08 %
Hémine	0,0005 %
Méladione	0,00005 %
Polyanéthol Sulfonate de Sodium (PSS)	0,020 %
Chlorhydrate de pyridoxal (vitamine B6)	0,001 %
Résine absorbante non ionique	10,0 %
Résine échangeuse de cations	0,60 %

3.6. Protocole de techniques des hémocultures positives : [13].

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

1. 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 nous préparons une coloration de Gram ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :

- Boîte de gélose au sang de cheval ou de mouton ;
- Boîte de gélose Mac Conkey ;
- Boîte 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 ;

2. Reporter tous les résultats sur la fiche de travail ;

3. Procéder à la lecture de la coloration de Gram :

- Si aucun microorganisme 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 ;
- Si des microorganismes 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, Cocco BGN, DCGN, Levures...)

4. le service de pédiatrie est informé du résultat positif de la coloration de Gram ;
5. lorsque des cocci 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 ;
6. les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO₂.
Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les Boîtes ;
7. 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;
8. dans les cas où des cocci Gram-positif sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :
 - a). enregistrer les résultats des tests des disques Optochine et de Bacitracine ainsi que le test de la catalase ;
 - b). si le micro- organisme est catalase- positif et ressemble au Staphylocoque (cocci 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 négatif après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative;
 - c). lorsque le micro- organisme est catalase- négatif, 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 Optochine) et diplocoque Gram-positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test 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 Gram-positif en chaîne), mais négatif au test du disque 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 ;

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

10. si des bactéries Gram-négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :

- 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 microorganismes isolés sont identifiés comme étant Salmonella, Shigella ou Vibrio, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;
- Si 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 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 ;

➤ Si 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 Gram-négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*. Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;

11. Procéder à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer ;

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

3.7. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques. [13].

Les procédures suivantes sont suivies pour le traitement et l'examen cyto-bactériologique du liquide céphalo-rachidien.

3.7.1. Traitement des prélèvements de LCR :

Les prélèvements sont reçus au laboratoire dans des tubes stériles et sont immédiatement identifiés puis enregistrés dans le registre de laboratoire.

Le reste du travail se fera sous une hotte à flux laminaire.

Les tests sur le LCR sont réalisés dans l'ordre suivant :

1. Nous identifions les boîtes de gélose ainsi que la lame pour le frottis (le numéro d'enregistrement, le type de prélèvement, la date de travail et les initiales du patient sont écrits) ;

2. Nous déposons sur les géloses au sang de cheval et ou chocolat 2 à 3 gouttes de LCR puis les boîtes de gélose sont refermées. Nous laissons imbiber la gélose par le LCR pendant quelques minutes ;

3. Une goutte de LCR est déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis;

4. Après avoir laissé sécher le frottis, il est fixé par "chauffage" de la lame à l'incinérateur de la hotte pendant 5 secondes au maximum ;

5. Comptage cellulaire du LCR ;

Nous remplissons l'hémocytomètre de LCR (cellule de Kova) qui est ensuite laissé au repos pendant 2 à 3 min pour le comptage cellulaire ; Le comptage se fait au microscope optique, nous examinons avec objectifs x10 pour la mise au point à l'aide de la vis macro métrique et la qualité de l'image améliorée à l'aide de la vis micrométrique.

Nous comptons les éléments sur l'ensemble de la cellule à l'objectif x 40 au cas où les éléments figurés sont peu nombreux, dans le cas où les éléments sont nombreux et pratiquement identiques dans les cases de la grille, nous choisissons une case dans laquelle nous comptons les éléments et nous les multiplions par 81 pour obtenir le nombre d'éléments (hématies et ou leucocytes) par mm^3 .

NB : Ne compter que les cellules situées à l'intérieur des traits de la grille.

Méthode de calcul alternatif : Faire la moyenne des cellules comptées par petits carrés et multiplier par 81 pour obtenir le nombre de cellules par mm^3 ;

6. Nous revenons pour ensemer les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et la gélose chocolat. Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur à CO_2 en les renversant ;

7. Nous réalisons les tests d'agglutination sur le LCR direct avec le sérum latex Pastorex meningitis kit ou le sérum latex Slidex méningitis sont ensuite réalisés selon la disponibilité, dont le principe est le suivant :

Les réactifs sont constitués de particules de latex sensibilisées par des antisérums spécifiques, permettent, par une technique d'agglutination rapide sur carte, de détecter l'antigène correspondant dans le prélèvement.

Le coffret de Slidex méningitis contient les réactifs suivants :

- réactif R1 : Latex *Haemophilus influenzae* type b.
- réactif R2 : Latex *Streptococcus pneumoniae*.
- réactif R3 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe A.
- réactif R4 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1.
- réactif R5 : Latex *Neisseria meningitidis* groupe C.
- réactif R6 : Contrôle Positif, extrait antigénique de : *Haemophilus influenzae* type b. [14].

Le coffret de Pastorex meningitis kit contient les réactifs suivants :

- réactif R1 : *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1.
- réactif R2 : *Neisseria meningitidis* groupe B/ *Escherichia coli* K1 contrôle négatif.
- réactif R3 : *Haemophilus influenzae* type b.
- réactif R4 : *Streptococcus pneumoniae*.
- réactif R5 : *Streptococcus* groupe B.
- réactif R6 : *Neisseria meningitidis* groupe A.
- réactif R7 : *Neisseria meningitidis* groupe C.
- réactif R8 : *Neisseria meningitidis* groupe Y/W135.
- réactif R9 : Contrôle polyvalent négatif.
- réactif R10 : Contrôle polyvalent positif. [15]

8. Nous procédons à la coloration de Gram ;

Les autres liquides biologiques (liquide pleural, liquide péricardique, liquide articulaire) sont traités comme le LCR.

9. Le reste du prélèvement de LCR est gardé au laboratoire sur la paillasse de travail pendant 5 jours.

Les résultats suivants doivent être notifiés au service de pédiatrie dans les deux heures qui suivent la réception du prélèvement au laboratoire, il s'agit :

- du résultat de la coloration de Gram ;
- du résultat du comptage cellulaire ;
- du résultat des tests d'agglutination.

Nous préparons "une fiche de travail LCR" pour y enregistrer le nom du patient, le numéro de dossier ou le numéro de GDH et la date du prélèvement. Tous les résultats des tests sont enregistrés sur cette fiche de travail et saisis sur le support informatique.

3.7.2. Protocole de travail de la Culture du LCR :

1. Les géloses au sang et au chocolat sont examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats sont enregistrés sur la fiche de travail et saisis sur le support informatique.

2. Si une colonie bactérienne est observée sur les géloses, une coloration de Gram est effectuée. Les résultats de la coloration de Gram ainsi que la description des colonies sont enregistrés sur la fiche de travail.

Le service de pédiatrie est informé de la positivité de la culture du LCR.

3. Nous suivons les procédures d'identification pour les cultures positives.

3.8. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries :

3.8.1. Coloration de Gram :

Principe :

La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en micro-organismes Gram-positif et en micro-organismes Gram-négatif. Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et ont une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram-négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution d'alcool acétone. Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuschine basique).

C'est parce que la coloration de Gram est très importante, qu'elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

Matériels et réactifs utilisés :

- Microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100 ;
- Huile à immersion ;
- Coffret de colorants de Gram contenant ;
- Violet de gentiane ou cristal violet ;
- Solution de lugol ;
- Solution de décolorant alcool acétone ;
- Safranine ou fuschine basique ;
- Lames porte- objet ;
- Portoir de lame ;
- Crayon de papier ;
- Papier buvard ;
- Flacon d'eau distillée ;
- Bac de coloration.

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, sinon 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 Gram-positif pourraient apparaître comme 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 frotter la lame pour la faire sécher.

Interprétation :

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

Par exemple :

Cocci Gram-positif en grappes = Staphylocoques.

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

Cocci Gram-positif en chaînettes = Streptocoques.

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

Cocci Gram-positif en paires = *Streptococcus pneumoniae* ou Enterococcus.

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

Bacilles Gram- positif : égale plusieurs micro-organismes.

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

Cocci Gram-négatif en paires = Neisseria

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

Bacilles Gram-négatif = Plusieurs micro-organismes.

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

3.9. Tests biochimiques et métaboliques :

3.9.1. Oxydase :

Principe :

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

Matériels et réactifs utilisés :

Papier buvard

Anse

Réactif d'oxydase : Phénylène- diamine

Procédure :

- Avec un écouvillon stérile prendre une à deux colonies de bactéries bien isolées dans une boîte de gélose (Ne pas utiliser une gélose MacConkey)
- Placer une à deux gouttes d'oxydase sur l'écouvillon.

Interprétation :

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

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

Contrôle de Qualité :

- Le test d'oxydase est très important pour l'identification des bactéries Gram-négatif.

Les bactéries, oxydase positives, les plus connues sont Neisseria, Haemophilus, Pseudomonas, Vibrio. Les bactéries, oxydase négatives, les plus connues sont les Enterobacteriaceae, une grande famille de bactéries qui inclut Klebsiella, Escherichia, Salmonella, Shigella.

- Un test d'oxydase ne peut pas être réalisé avec des colonies de bactéries isolées sur une gélose MacConkey parce que les colorations dans la gélose pourraient causer une réaction faussement positive.

3.9.2. Galeries classiques pour entérobactéries :

3.9.2.1. Test à l'ONPG :

Principe :

Bien que certaines bactéries possèdent une enzyme intracellulaire (E) capable de scinder la molécule de lactose en galactose et glucose (sucre fermenté par toutes les entérobactéries), comme par exemple la bêta galactosidase (en abrégé β gal) ; elles ne fermentent pas ou fermentent tardivement le lactose.

Chez les bactéries, une autre enzyme (P) (perméase par exemple la galactoside perméase), qui permet la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne, est absente ou n'est pas fonctionnelle.

Le test ONPG est une méthode simple et rapide, qui permet de rechercher directement l'enzyme (E) et par suite de distinguer les bactéries potentiellement lactose positives des bactéries lactose négatives.

Il présente un grand intérêt diagnostique : comme le lactose, l'ONPG (= Orthonitrophényl – β – galactopyranoside) composé incolore, est scindé par l'enzyme (E) en libérant de l'orthonitrophénol soluble en jaune.

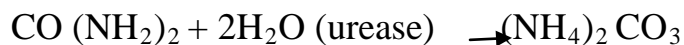
Klebsiella est ONPG positive.

3.9.2.2. Recherche de l'uréase :

Principe :

L'urease est mise en évidence au moyen du milieu «urée indole » ; milieu synthétique utilisé pour rechercher simultanément l'urease, le tryptophane – désaminase (TDA) et la production d'indol.

Dans ce milieu tamponné, les bactéries qui possèdent une urease suffisamment active, transforment l'urée en carbonate d'ammonium, selon la réaction :



Il en résulte une alcalinisation du milieu dans des délais plus ou moins rapides.

3.9.2.3. Recherche de l'indole.

Principe :

Certaines bactéries possèdent une tryptophanase, capable de scinder la molécule de tryptophane en donnant de l'indole suivant la réaction :

A partir de la culture en eau peptonée ou de suspension bactérienne en milieu « urée – indole » ; qui fermentent toutes deux du tryptophane, on peut rechercher la production d'indole à l'aide du réactif de Kovacs (anneau rouge).

La présence d'indole est relevée par un anneau rouge en surface.

3.9.2.4. Recherche du thiosulfate- réductase (production de H₂S) :

Principe :

Cette enzyme permet de réduire $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$ en S^{--} . L'anion S peut être relevé grâce à la coloration noire de certains sulfures métalliques : sulfure de fer (milieu Hajna-Kligler), sulfure de plomb (gélose au sous – acétate de plomb).

3.9.2.5. Réaction de Voges- Proskauer :

Principe :

Les bactéries dites Voges – Proskauer positives (VP⁺) possèdent une voie métabolique particulière dans la fermentation des hexoses. A partir de l'acide pyruvique CH₃CO – COOH, produit d'oxydation du glucose, elles peuvent former de l'acétyle méthyle carbinol (= acetoïne) : CH₃CO – CHOH – CH₃ et du butane diol 2-3 : CH₃ – CHOH – CHOH – CH₃.

La présence de ces deux composés est décelée par la réaction de VP : en milieu fortement alcalin, ils sont oxydés en diacétyl : CH₃ CO – COCH₃, qui réagit avec le groupement guanidine des peptones pour produire un complexe de couleur rose rouge cerise ; l'alpha – naphтол accélère cette réaction colorée. D'une façon générale, les produits de dégradation obtenus par les bactéries qui possèdent cette voie métabolique, présentent une réaction peu acide (virage au jaune du rouge de méthyle : RM⁺).

3.9.2.6. Milieu synthétique au citrate de Simmons :

Principe :

Le milieu au citrate de Simmons est un milieu minéral synthétique tamponné avec comme source d'azote un sel d'ammonium et comme source unique de carbone et d'énergie du citrate, dont l'utilisation en aérobiose par certaines bactéries se traduit par leur croissance et l'alcalisation du milieu. Les entérobactéries, qui exigent des facteurs de croissance (auxotrophes, par exemple : Salmonella Typhi et les Shigella), ne peuvent pas pousser sur ce milieu.

3.9.2.7. Recherche des décarboxylases et dihydrolase (LDC, ODC, ADH).

Principe : Les décarboxylases sont des enzymes qui décarboxylent les acides aminés en formant l'amine correspondante avec dégagement de CO₂.

Les décarboxylases présentant un intérêt taxonomique sont :

- la lysine – décarboxylase ou LDC (lysine → cadavérine) ;
- l'ornithine – décarboxylase ou ODC (ornithine putrescine) ;
- l'arginine – décarboxylase et dihydrolase ou RDH (arginine → agmatine et ornithine). [16]

Le milieu de Hajna-Kligler :

Le milieu de Hajna-Kligler est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des Entérobactéries.

Milieu urée – indole :

- Milieu urée – indole On utilise ce milieu pour mettre en évidence la décomposition de l'urée (présence d'uréase).

3.10. Galerie API 20E :



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

3.11. 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 l'organisme est sensible). Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon les résultats ne seront pas précis.

3.12. Conservation des cultures pures :

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence. Elles sont fréquemment utilisées pour l'enseignement, le contrôle ou pour la recherche. L'intérêt de se référer à des souches standard est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est

le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis. En Angleterre, la plus connue est la «National Collection of Type Cultures» (NCTC). En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris. Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître.

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

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

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

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

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

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

Les souches sont conservées dans un congélateur de - 90° C à - 65° C.

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D
N° B-P
N° D et G I
I P /E ₂

E = Etage du congélateur ; B = Bloc ; T = Tiroir ; D = Date.

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

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

I P /E₂ : initiale du patient /Etude 2. [7] ; [14].

4. PRESENTATION DES RESULTATS :

Les résultats sont saisis sur Microsoft Word, vu la petite taille de notre échantillon nous avons fait une étude descriptive.

4.1. Résultats globaux :

De 2002 à 2007 nous avons effectué 16878 prélèvements d'hémocultures dont 3505 sont positifs soit 21 %. Pendant la même période 6126 prélèvements de LCR ont été analysés dont 1917 sont positifs soit 31. Il a été réalisé pendant la même période 397 prélèvements d'autres liquides biologiques (articulaire, péritonéal, musculaire, sous-cutané, pleural, abcès cérébral etc.) dont 216 sont positifs soit 54 %.

Le nombre total de Klebsiella isolé est de 43.

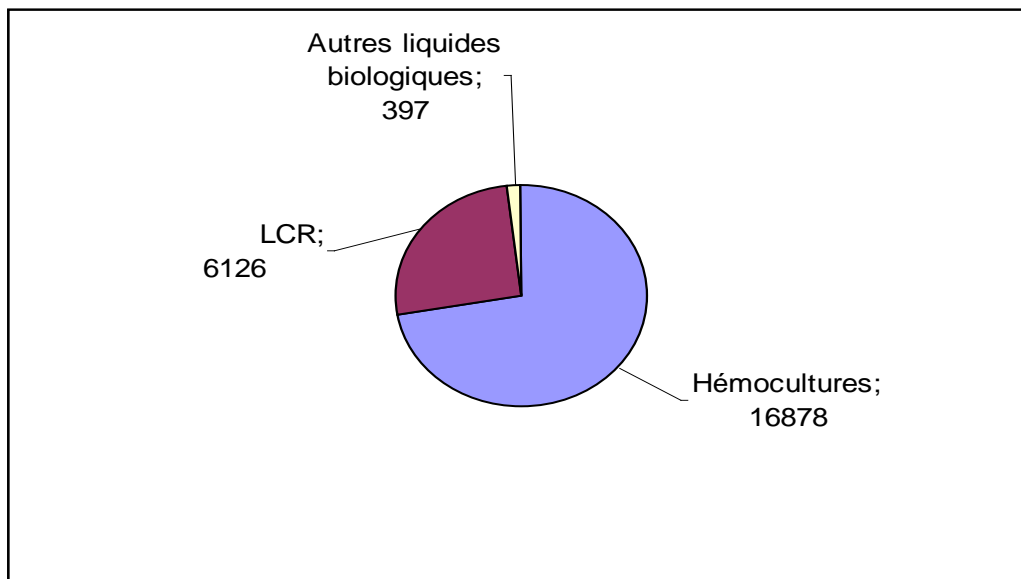


figure 3 : Répartition selon le type de prélèvement.

4.2. Présentation des résultats sociodémographiques.

Tableau 2 : Répartition des Klebsiella selon l'âge, le sexe, la résidence et le Devenir.

N° Ordre	Age	sexe	Date	Résidence	Devenir
1	120Mois	M	05/03/2002	CIV	Décédé
2	1Mois	F	04/07/2002	Kati	Inconnu
3	1Mois	F	23/11/2002	C VI	Décédé
4	164Mois	M	13/12/2002	C I	Inconnu
5	1Mois	F	26/02/2003	Kati	Amélioré
6	1Mois	M	12/04/2003	Koulikoro	Amélioré
7	60Mois	M	15/04/2003	C IV	Amélioré
8	6Mois	M	18/04/2003	C III	Inconnu
9	12Mois	F	04/09/2003	C II	Inconnu
10	24Mois	M	29/10/2003	C IV	Inconnu
11	13Jours	M	13/04/2004	C VI	Décédé
12	6 Jours	M	19/04/2004	C III	Amélioré
13	1Mois	M	08/08/2004	C VI	Décédé
14	6 Jours	M	20/10/2004	Kati	Inconnu
15	24Mois	F	21/11/2004	C IV	Amélioré
16	2 Jours	M	08/12/2004	C I	Inconnu
17	15Mois	F	04/06/2005	C II	Inconnu
18	29Mois	M	06/07/2005	C III	Décédé
19	18Mois	F	04/08/2005	C IV	Décédé
20	18Mois	F	25/09/2005	C V	Amélioré
21	12Mois	M	15/10/2005	C VI	Amélioré

N° Ordre	Age	sexe	Date	Résidence	Devenir
22	14 Jours	M	24/05/2006	Koulikoro	Décédé
23	27 Jours	F	11/07/2006	C IV	Amélioré
24	2Mois	M	10/082006	C II	Décédé
25	4 Jours	M	21/09/2006	C I	Décédé
26	24 Jours	M	07/01/2007	C IV	Décédé
27	8Mois	F	05/05/2007	C III	Décédé
28	19Mois	F	18/06/2007	C II	Décédé
29	2Mois	M	10/09/2007	C III	Décédé
30	8Mois	M	24/09/2007	C III	Amélioré
31	1Mois	F	04/07/2002	C I	Inconnu
32	24Mois	F	04/08/2002	C VI	Séquelles
33	3Mois	M	02/05/2003	C I	Inconnu
34	5Mois	F	27/05/2003	C IV	Amélioré
35	2 Jours	M	19/04/2004	C VI	Amélioré
36	2Mois	F	10/09/2007	C III	Décédé
37	144Mois	M	17/05/2002	Koulikoro	Amélioré
38	96Mois	F	26/10/2002	Koulikoro	Amélioré
39	1Mois	M	11/12/2002	C I	Inconnu
40	96Mois	M	11/01/2003	C VI	Amélioré
41	108Mois	F	24/02/2005	C I	Inconnu
42	96Mois	M	28/03/2007	C V	Amélioré
43	4Mois	F	10/07/2002	C IV	Amélioré

KHI = 2,71

ddl = 2

P = 0,25

Tableau 3 : Répartition des patients en fonction du sexe.

Sexes	Nombre	%
Masculin	25	58,14
Féminin	18	41,86
Total	43	100

Le *sex ratio* est en faveur du sexe masculin soit 1,4.

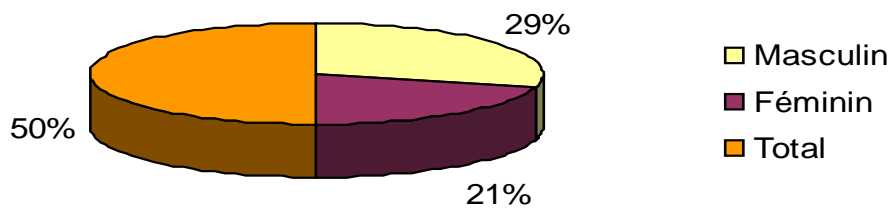
**figure 4** : Répartition des patients en fonction du sexe.

Tableau 4 : Répartition des enfants en fonction de l'âge.

Ages	Nombre	%
0 à 28 jours (nouveau- nés)	9	20,94
29 jours à 3 ans (nourrissons)	26	60,46
4 ans à 5 ans (petit- enfants)	1	2,32
6 ans à 14 ans (enfants)	7	16,28
TOTAL	43	100

Tous les patients sont des enfants, la tranche d'age des nourrissons (de 1 mois à 3 ans) est la plus infectée.

Tableau 5 : Répartition des enfants en fonction de leur devenir.

Devenir	Nombre	%
Améliorés	16	37, 21
Guéri avec séquelles	1	2,32
Inconnu	12	27, 91
Décédés	14	32, 56
TOTAL	43	100

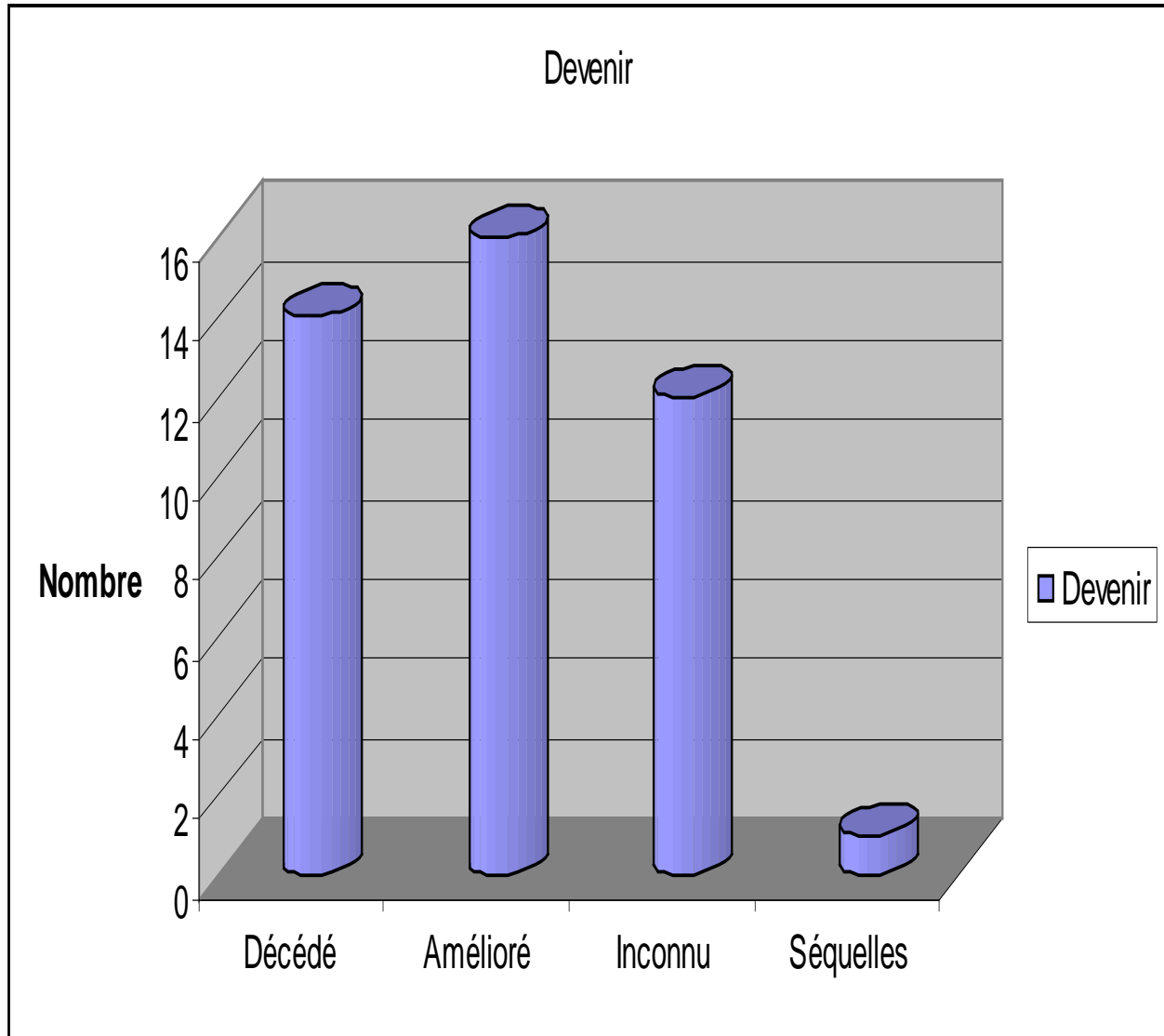


figure 5 : Répartition des enfants en fonction de leur devenir.

32,56% des patients sont décédés, 37,21% d'amélioration et 27,91% de disparus.

Tableau 6 : Répartition des cas selon la résidence et l'année.

Résidences Années	C I	CII	CIII	CIV	C V	CVI	Kati	Koulikoro
2002	03	00	00	02	00	02	01	02
2003	01	01	01	03	00	01	01	01
2004	01	00	01	01	00	03	01	00
2005	01	01	01	01	01	01	00	00
2006	01	01	00	01	00	00	00	01
2007	00	01	04	01	01	00	00	00
Total	7	4	7	9	2	7	3	4

La commune IV est la plus touchée suivie des communes I, III et VI.

4.3. Etude bactériologique des prélèvements :

4.3.1. Fréquence des germes isolés :

Tableau 6 : Résultats des hémocultures.

DESIGNATIONS	ANNEES						Total	%
	2002	2003	2004	2005	2006	2007		
Total	1978	1672	1843	4097	4375	2913	16878	100
Résultats négatifs	1471	1182	1328	3329	3639	2424	13373	79
Résultats positifs	507	490	515	768	736	489	3505	21
Nature des germes isolés								
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	78	100	115	178	221	153	845	5.00
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	12	99	122	148	96	42	519	3.07
<i>Salmonella enterica</i>	60	48	39	28	52	45	272	1.61
<i>Salmonella Typhi</i>	56	20	13	50	25	16	180	1.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	29	27	49	38	11	177	1.04
<i>Escherichia coli</i>	17	08	17	28	23	11	104	0.61
<i>Salmonella paratyphi B</i>	16	11	06	46	45	25	149	0.88
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	03	05	04	04	05	24	0.14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	06	02	02	05	01	19	0.11
<i>Neisseria meningitidis W135</i>	02	08	01	00	00	00	11	0.06
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	03	06	01	00	00	00	10	0.05
<i>Neisseria meningitidis groupe A</i>	01	04	04	02	09	13	33	0.19
<i>Streptococcus β hémolytique groupe A</i>	03	02	03	02	03	02	15	0.09
<i>Enterococcus</i>	01	01	05	03	03	01	14	0.08
<i>Streptococcus groupe B</i>	04	01	01	00	00	00	06	0.03
<i>Morganella morganii</i>	01	02	02	02	00	00	07	0.04
<i>Citrobacter species</i>	02	01	01	00	01	00	05	0.03
<i>Citrobacter freundii</i>	02	00	02	02	02	02	10	0.05
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	01	00	00	00	03	0.02
<i>Salmonella arizonae</i>	01	01	01	00	00	00	03	0.02
<i>Salmonella paratyphi A</i>	01	01	01	02	02	04	11	0.06
<i>Pseudomonas putida</i>	00	01	01	00	01	00	03	0.02
<i>Salmonella paratyphi C</i>	01	00	01	02	01	02	07	0.04
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	04	04	00	10	0.05
<i>Neisseria meningitidis groupe C</i>	00	00	01	00	00	00	01	0.006
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	00	00	01	01	00	01	03	0.02
<i>Proteus mirabilis</i>	01	00	00	01	00	00	02	0.01
<i>Acinetobacter baumannii</i>	00	00	00	01	00	00	01	0.06
<i>Acinobacter calcovar</i>	00	00	00	02	01	02	05	0.03
<i>Serratia liquefaciens</i>	00	00	00	00	01	00	01	0.006
<i>Flavobacter odoratum</i>	00	00	00	00	02	00	02	0.01
<i>Aeromonas spp</i>	00	00	00	00	01	00	01	0.006
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	01	00	01	00	00	03	0.02
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	00	00	01	00	00	00	01	0.006
<i>Shigella spp</i>	00	00	00	01	01	00	02	0.01
<i>Streptococcus spp</i>	00	00	00	02	02	00	04	0.02
<i>Enterobacter sakazakii</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
<i>Salmonella choleraesuis</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
<i>Pseudomonas cepacia</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
<i>Chromobacterium violaceum</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
<i>Cocco Bacille Gram Négatif</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.006
Contaminants :								
<i>Staphylococcus non aureus (SNA)</i>	143	119	123	156	143	128	812	4.81
<i>Bacilles Gram Positif (BGP)</i>	54	16	18	40	30	25	183	1.08
<i>Levures</i>	01	01	01	01	00	00	04	0.02

Tableau 7 : Résultats des LCR de 2002 à 2007

DESIGNATIONS	ANNEES						Total	%
	2002	2003	2004	2005	2006	2007		
Total	788	981	1038	1408	1252	659	6126	100
Résultats négatifs	385	485	522	1195	1098	524	4209	69
Résultats positifs	403	496	516	213	154	125	1917	31
Germes identifiés								
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	52	75	87	108	54	26	402	6.56
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	45	68	77	71	83	62	406	6.63
<i>Salmonella enterica</i>	15	14	06	00	1	00	36	0.59
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	02	18	09	02	9	32	72	1.2
<i>Escherichia coli</i>	04	05	05	02	1	00	17	0.28
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	00	08	06	00	00	01	15	0.24
<i>Salmonella typhi</i>	03	01	04	01	1	00	10	0.16
<i>Proteus mirabilis</i>	01	04	03	01	00	01	10	0.16
<i>Neisseria spp</i>	00	02	00	00	00	00	02	0.03
<i>Streptococcus</i> non hémolytique	01	02	04	01	1	00	09	0.14
<i>Staphylococcus aureus</i>	03	02	02	04	1	00	12	0.19
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	05	01	01	00	00	00	07	0.11
<i>Streptococcus</i> groupe B	01	01	03	00	00	00	05	0.08
<i>Salmonella paratyphi</i> B	01	01	03	05	01	00	11	0.18
<i>Enterococcus spp</i>	01	02	01	01	00	00	05	0.08
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	02	01	00	00	01	06	0.10
<i>Pseudomonas putida</i>	02	01	01	00	00	00	04	0.06
<i>Moraxella specie</i>	01	01	01	00	00	00	03	0.05
<i>Klebsiella ozaenae</i>	01	01	01	00	00	00	03	0.05
<i>Acinetobacter calcovar</i>	00	01	02	00	00	00	03	0.05
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	01	01	00	00	01	03	0.05
<i>Enterobacter agglumera</i>	00	01	01	00	01	00	03	0.05
<i>Citrobacter freundii</i>	00	01	01	00	00	00	02	0.03
<i>Morganella morganii</i>	00	01	01	00	00	00	02	0.03
<i>Salmonella paratyphi</i> A	00	01	00	00	00	00	01	0.02
<i>Enterobacter cloacae</i>	00	00	01	01	00	00	02	0.03
<i>Enterobacter sakasaki</i>	00	00	01	00	00	00	01	0.02
<i>Flavobacter meningoseptocum</i>	00	00	00	01	00	00	01	0.02
<i>Pseudomonas fluorescent</i>	00	00	00	00	00	01	01	0.02
Contaminants								
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	235	248	252	09	00	00	744	12.14
Bacilles Gram Positif (BGP)	28	34	36	03	01	00	102	1.66
Levures	01	02	04	00	00	00	07	0.11

Tableau 8 : Résultats des autres prélèvements de 2002 à 2007 : liquides pleuraux, articulaires, sous-cutané, péritonéal et musculaire, pus et abcès cérébral.

DESIGNATIONS	ANNEES						Total	%
	2002	2003	2004	2005	2006	2007		
Total	53	80	60	77	70	57	397	100
Résultats négatifs	15	34	23	27	52	30	181	46
Résultats positifs	38	46	37	50	18	27	216	54
Germe identifiés								
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	01	02	03	03	00	01	10	2.52
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	02	10	05	07	05	04	33	8.31
<i>Salmonella enterica</i>	03	03	01	01	00	00	08	2.01
<i>Escherichia coli</i>	00	04	03	03	02	01	13	3.27
<i>Salmonella typhi</i>	00	00	00	01	00	01	02	0.50
<i>Proteus mirabilis</i>	02	03	02	01	00	00	06	1.50
<i>Streptococcus non hémolytique</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	16	13	23	09	10	87	21.9
<i>Streptococcus β hémolyt. gr A</i>	01	00	02	00	00	00	03	0.75
<i>Salmonella paratyphi B</i>	00	00	00	00	00	01	01	0.25
<i>Enterococcus spp</i>	00	00	00	02	00	01	03	0.75
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	02	01	00	00	00	01	04	1.00
<i>Acinetobacter calcovar</i>	00	01	02	00	00	00	03	0.75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01	00	01	00	01	00	03	0.75
<i>Citrobacter freundii</i>	01	01	01	00	00	00	03	0.75
<i>Morganella morganii</i>	00	00	00	01	00	00	01	0.25
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	00	00	00	02	0.50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	01	00	00	01	00	00	02	0.50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	01	01	00	00	00	00	02	0.50
<i>Serratia fonticola</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.25
<i>Serratia odorifera</i>	00	00	01	00	00	00	01	0.25
<i>Pseudomonas cepacia</i>	01	00	00	00	00	00	01	0.25
<i>Citrobacter youryae</i>	00	01	00	00	00	00	01	0.25
<i>Streptococcus non pneumoniae</i>	01	00	00	00	03	00	04	1.00
<i>Pseudomonas spp</i>	01	01	00	00	00	00	02	0.50
<i>Aeromonas hydrophila</i>	00	01	00	00	00	00	01	0.25
Contaminants								
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	02	07	03	08	02	07	29	7.30
Bacilles Gram Positif (BGP)	02	01	00	00	00	00	03	0.75
Levures	00	00	00	00	00	00	00	0.00

- Seul le résultat de la culture finale a été pris en compte pour les germes ;
- Les Bacilles Gram Positifs (BGP), les staphylocoques à coagulase négative et les levures sont considérés comme des contaminants.

Tableau 9 : Total des prélèvements effectués au CHU Gabriel Touré chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2007.

ANNEES	PRELEVEMENTS					
	Hémocultures		LCR		Autres liquides	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
2002	1978	11,72	788	12,86	53	13,35
2003	1672	9,91	981	16,01	80	20,15
2004	1843	10,92	1038	16,94	60	15,11
2005	4097	24,27	1408	22,98	77	19,39
2006	4375	25,93	1252	20,44	70	17,63
2007	2913	17,25	659	10,76	57	14,36
Total	16878	100%	6126	100%	397	100%

Il a été effectué 16878 hémocultures, 6126 LCR et 397 autres liquides.

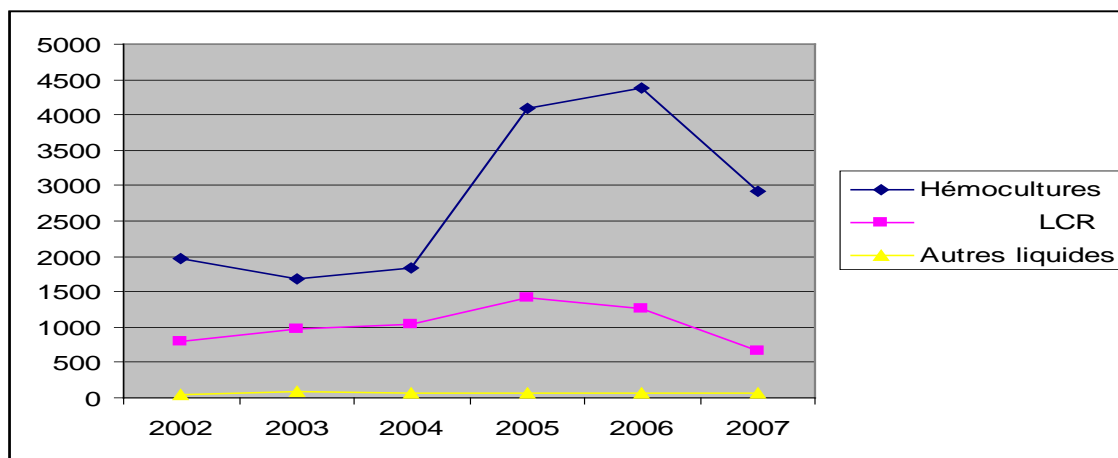


figure 6 : Evolution des différents prélèvements de 2002 à 2007.

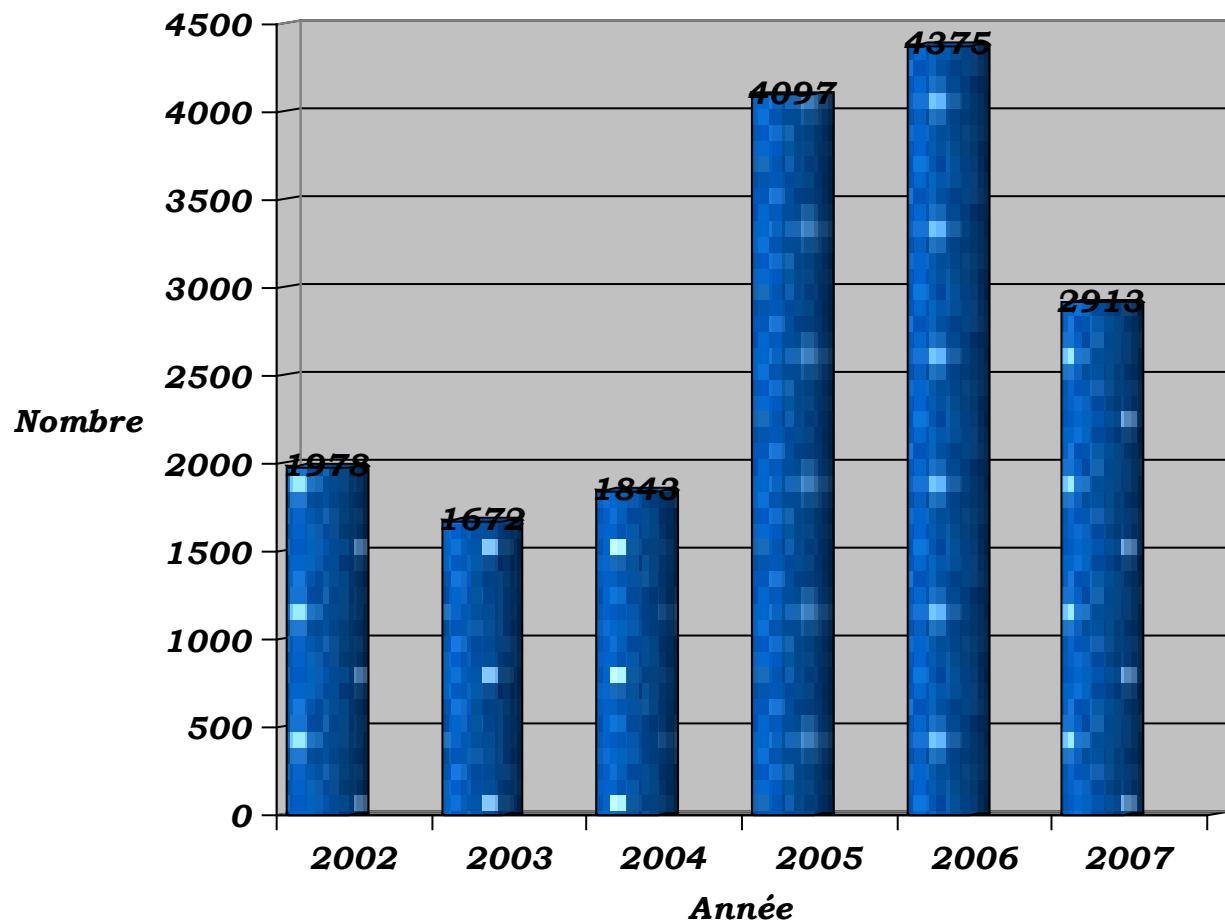


figure 7 : Représentation graphique des prélèvements d'hémocultures par année.

En 2006 il a été effectué plus de prélèvements soit 4375.

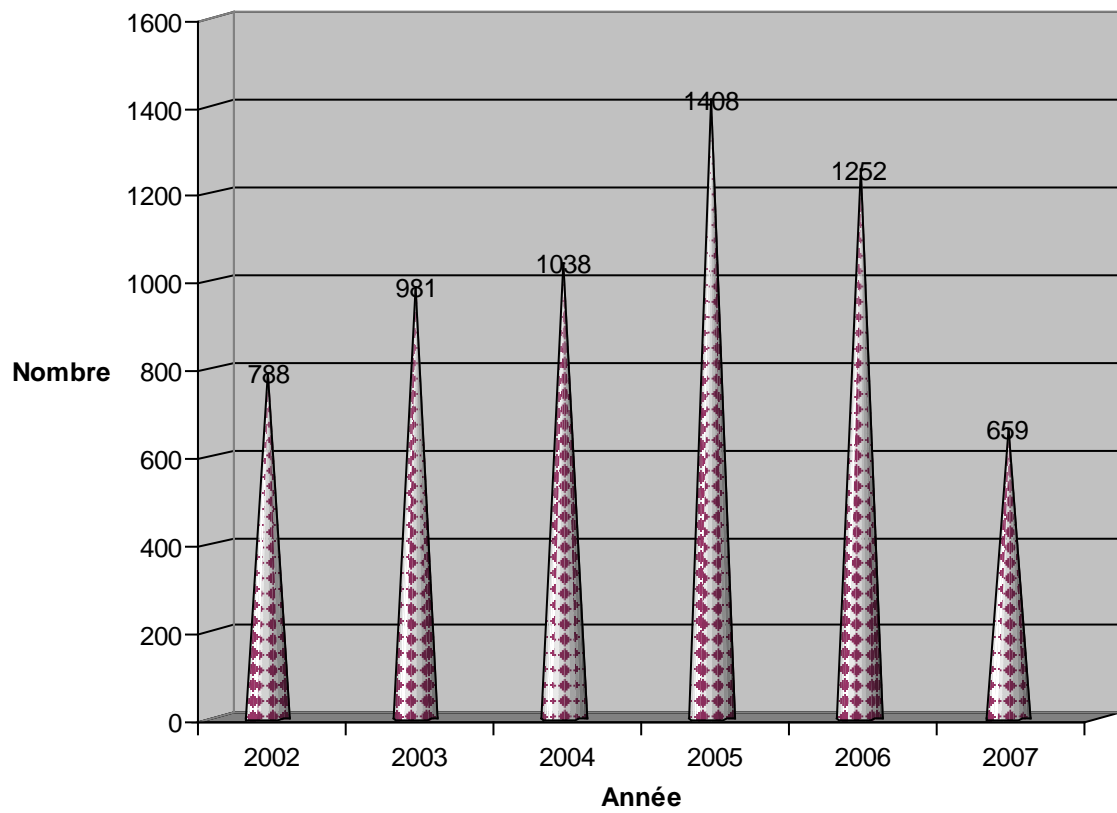


figure 8: Représentation graphique des prélèvements de LCR par année

On a reçu plus de prélèvements en 2005.

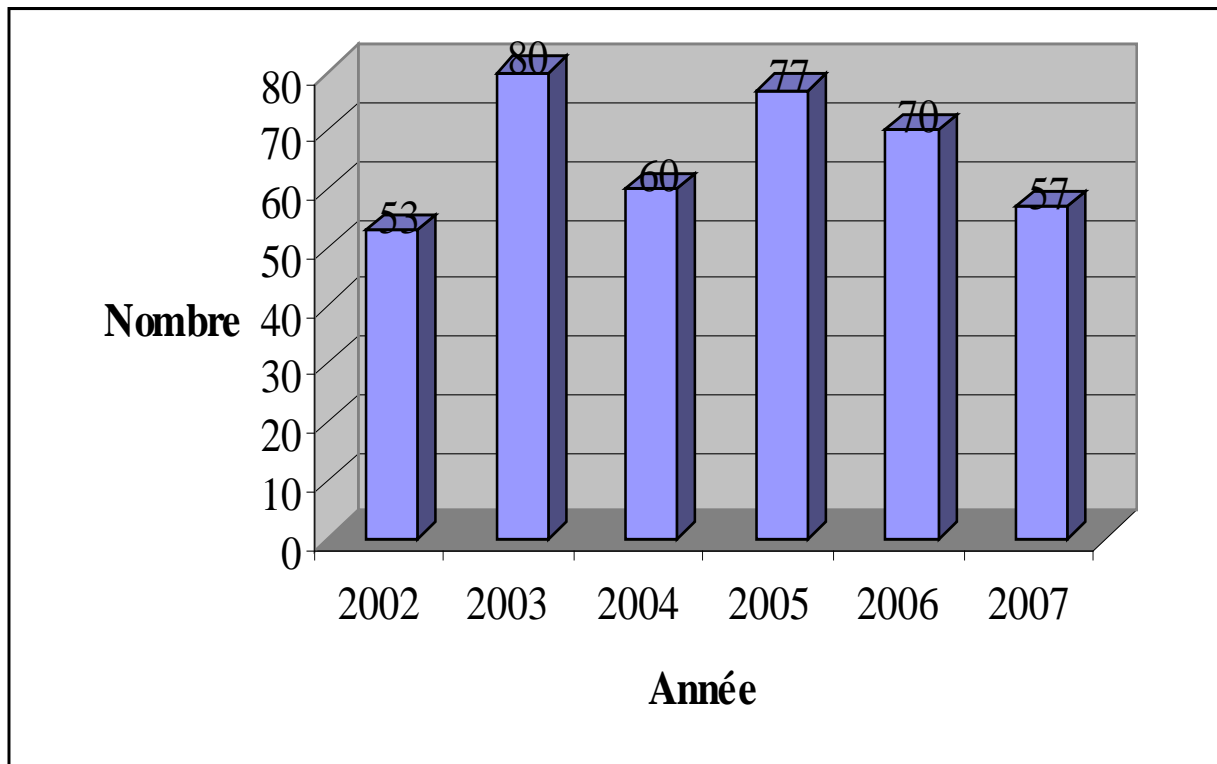


figure 9 : Représentation graphique des prélèvements des Autres liquides par année.

On a reçu plus de prélèvement en 2003.

Tableau 10 : Résultat des Hémocultures effectuées au CHU Gabriel Touré chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2007.

Types de prélèvements et cultures		Résultats cultures	Nombre	Pourcentage
Hémocultures	BACTEC® positif	Cultures avec germes	2466	14,61
		Cultures avec contaminants	999	5,92
		Cultures négatives	40	0,24
	Total		3505	20,77
	BACTEC® négatif	Cultures négatives	13373	79,23
Total			16878	100,00

Les cultures avec germes représentent 14,61%.

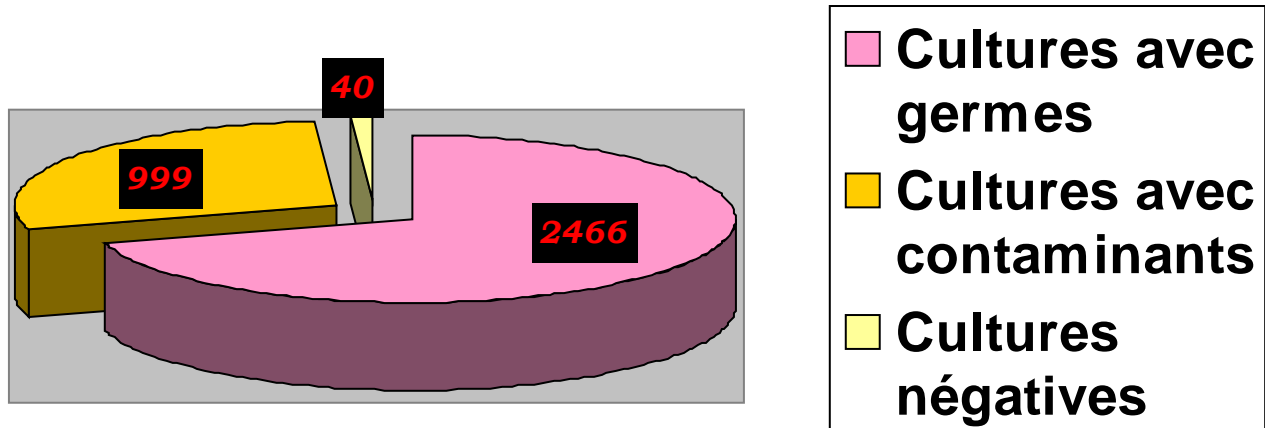


figure 10 : Représentation graphique du résultat de la culture du BACTEC® positif.

Tableau 11 : Résultats des LCR effectués à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2007.

Types de prélèvements et cultures		Résultats par		
		isolement	Nombre	Pourcentage
LCR en culture sur gélose	Cultures positives	Cultures avec germes	1064	17,36
		Cultures avec contaminants	853	13,64
	Total		1917	31,00
	Cultures négatives	Négative	4209	69,00
Total			6126	100,00

Le nombre de cultures avec germes est de 1064 soit 17,36 %.

Tableau 12 : Résultats des Autres liquides effectués à l'HGT chez les enfants de moins de 18 ans de 2002 à 2007.

Types de prélèvements et cultures		Résultats par		
		isolement	Nombre	Pourcentage
Autres liquides	Cultures positives	Cultures avec germes	184	45,95
		Cultures avec contaminants	32	8,05
	Total		216	54,00
	Cultures négatives	Négative	181	46,00
Total			397	100,00

Le nombre de cultures avec germes est de 184 soit 45,95 %.

Tableau 13 : Récapitulatif des bactéries du genre Klebsiella isolées au laboratoire de 2002 à 2007.

<i>Klebsiella</i> identifiés	Années						Total
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	06	05	07	04	04	07	33
<i>Klebsiella oxytoca</i>	03	01	00	02	01	00	06
<i>Klebsiella ozaenae</i>	01	01	01	00	00	00	03
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	00	00	00	00	00	00	00
<i>Klebsiella terrigena,</i>	00	00	00	00	00	00	00
<i>Klebsiella planticola</i>	00	00	00	00	00	00	00
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	00	00	01	00	00	00	01
<i>Klebsiella spp</i>	00	00	00	00	00	00	00

4.3.2. Profil antibiotique des espèces de *Klebsiella* isolées :**Tableau 14 :** Sensibilité des espèces de *Klebsiella* testées à l'Ampicilline.

Espèces	ATB	Ampicilline						
		Effectif	S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		33	0	0	0	0	33	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>		6	0	0	0	0	6	100
<i>Klebsiella ozaenae</i>		3	0	0	0	0	3	100
<i>Klebsiella ornitholytica</i>		1	0	0	0	0	1	100

L'ensemble des différentes espèces de *Klebsiella* reste résistant à l'Ampicilline.

Tableau 15 : Sensibilité des espèces de *Klebsiella* testées au Chloramphénicol.

Espèces	ATB	Chloramphénicol						
		Effectif	S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		33	7	21,22	1	3,03	25	75,75
<i>Klebsiella oxytoca</i>		6	2	33,33	1	16,67	3	50,00
<i>Klebsiella ozaenae</i>		3	0	0	0	0	3	100
<i>Klebsiella ornitholytica</i>		1	0	0	1	100	0	100

La majorité des différentes espèces de *Klebsiella* reste résistant au Chloramphénicol.

Tableau 16 : Sensibilité des espèces de Klebsiella testées au Céftriaxone.

Espèces	ATB		Céftriaxone				
	Effectif	S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	13	39,40	0	0	20	60,60
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	6	100	0	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	3	3	100	0	0	0	0
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	0	0	1	100	0	0

La majorité des différentes espèces de Klebsiella reste résistant au Céftriaxone.

Tableau 17 : Sensibilité des espèces de Klebsiella testées au Cotrimoxazole.

Espèces	ATB		Cotrimoxazole				
	Effectif	S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	3	9,10	0	0	30	90,90
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	2	33,33	0	0	4	66,67
<i>Klebsiella ozaenae</i>	3	0	0	0	0	3	100
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	0	0	1	100	0	0

La majorité des différentes espèces de Klebsiella est résistants au Cotrimoxazole.

Tableau 18 : Sensibilité des espèces de Klebsiella testées à la Gentamicine.

Espèces	Effectif	Gentamicine					
		S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	0	0	0	0	33	100
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	0	0	0	0	6	100
<i>Klebsiella ozaenae</i>	3	0	0	0	0	3	100
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	0	0	0	0	1	100

L'ensemble des différentes espèces de Klebsiella est résistant à la Gentamicine.

Tableau 19: Sensibilité des espèces de Klebsiella testées à la Ciprofloxacine.

Espèces	Effectif	Ciprofloxacine					
		S	%	I	%	R	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	31	93,93	0	0	2	6,07
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	6	100	0	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	3	3	100	0	0	0	0
<i>Klebsiella ornitholytica</i>	1	0	0	1	100	0	0

Les différentes espèces de Klebsiella sont sensibles à la Ciprofloxacine.

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION:

Notre travail est effectué dans le cadre du diagnostic bactériologique des suspicions d'infections bactériennes invasives (SIBI) initié par le CVD Mali. L'étude mère est une étude rétro- prospective sur cinq ans et prospective sur un an basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives dues aux pathogènes responsables de septicémies et / ou de méningites bactériennes et hospitalisés dans les services de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE ou reçus en consultation ambulatoire.

Les critères d'inclusion des enfants admis de février 2002 à décembre 2007 ont porté sur l'âge ≤ 18 ans, la maladie fébrile (température $> 39^{\circ}$ C), être hospitalisé dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE, avoir une suspicion d'infection bactérienne invasive (SIBI), avoir le consentement éclairé des parents pour les enfants âgés de moins de 13 ans, le consentement des enfants de 13 à 18 ans est obligatoire. Les enfants âgés de 13 à 18 ans ne pouvant pas donner leur consentement à cause de l'état de gravité de leur maladie sont aussi inclus. Les prélèvements d'hémocultures sont effectués dans le service de pédiatrie et les flacons de BACTEC® 9050 y sont immédiatementensemencés. [17].

Du point de vue de la méthodologie :

Les prélèvementsensemencés sur bouillon BACTEC® 9050 adaptés au développement des germes responsables de septicémies de et/ou de méningites sont alors reçus au laboratoire. Les prélèvements sont identifiés, enregistrés dans les registres du travail. Les flacons du bouillon BACTEC® sont ensuite saisis dans l'appareil BACTEC ®pour garantir son efficacité.

Les échantillons reçus au laboratoire sont saisis sur support électronique dans le logiciel GDH (Global Digital Health) permettant de sécuriser les données et une analyse informatique depuis 2006.

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

La surveillance des hémocultures et la détection des cas positifs sont programmées volontairement sur une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques peuvent aller jusqu'à 10 jours.

L'intervention de l'utilisateur et les manipulations des bouteilles qui consistent à faire la coloration de Gram en fonction de la turbidité observée sur les hémocultures dans la méthode classique, sont minimisées dans la méthode du BACTEC®. En effet cette dernière est basée sur l'incubation, l'agitation de toutes les cultures et un signal immédiat des positifs (par un affichage sur l'écran à cristaux liquides une alarme sonore) concourent à diminuer le risque d'erreur humaine.

Les flacons positifs sont examinés alors conformément à la bactériologie de routine. La coloration de Gram, technique très importante, est accomplie avec le plus grand soin. [12].

Un examen préliminaire est fait sur le Liquide Céphalo- Rachidien (LCR), les hémocultures et les autres liquides biologiques dont le résultat est porté immédiatement à la connaissance des prescripteurs de la pédiatrie.

Dans le traitement du LCR, des techniques complémentaires comme les tests d'agglutinations latex, la cytologie (notamment le comptage des globules blancs et des globules rouges) sont faits dans le cadre des examens préliminaires.

Les résultats préliminaires et définitifs sont saisis dans le logiciel GDH, en plus de la saisie dans le registre de travail. Ce logiciel met en réseaux les services de consultation de la pédiatrie, le bureau CVD de la pédiatrie et le laboratoire. Il existe un transfert informatique des données via internet entre l'hôpital, le centre serveur au siège de CVD au CNAM et le CVD à l'université de Baltimore (Maryland- USA).

Du point de vue des résultats :

Au terme de notre étude de 2002 à 2007 nous avons étudié 16878 prélèvements d'hémocultures soit une moyenne annuelle de 2813. SAMAKE , en 2003 a travaillé sur 2198 prélèvements d'hémocultures. [18].

Dans la même période 2002- 2007, 6126 examens cyto bactériologiques du LCR ont été effectués soit une moyenne annuelle de 1021 contre 945 rapporté par SAMAKE . [19].

Il a été analysé dans la même période, 397 prélèvements provenant d'autres sites infectieux (articulaire, péritonéal, musculaire, sous- cutané, pleural, abcès cérébral etc.) soit une moyenne annuelle de 66 prélèvements.

Pour l'ensemble des prélèvements traités au cours de notre travail, il a été isolé 43 souches de Klebsiella.

Après *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, les bactéries du genre Klebsiella occupe le 7^{ème} rang des bactéries isolées au cours des hémocultures. Le genre Klebsiella occupe la 3^{ème} place des entérobactéries après *Salmonella* et *Escherichia coli*. OUOLOGUEM a obtenu un résultat similaire au cours de son étude au CHU du Point G en 2008. [20].

Pour SOUDE, Klebsiella occupe la première place des bactéries au cours des hémocultures au centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Maga de Cotonou en 2004.

Chez YAO ATTEBY et coll. *Klebsiella pneumoniae* (51,61%) a été le germe le plus fréquent dans les infections néonatales en 2000 au CHU de Treichville à Abidjan. [21].

En terme de fréquence d'isolement, les 43 souches de Klebsiella représentent 0.76% des agents infectieux pendant notre période d'étude contre 3,9% au . CHU du Point

G, [20], et 36,1% au CNHU de Cotonou[22], et 2,12% au CHU de FANN (DAKAR). [23].

Du point de vue sensibilité aux antibiotiques :

La sensibilité aux antibiotiques a été évaluée par la méthode de l'antibiogramme standard ou méthode de diffusion des disques d'antibiotiques. Seul les antibiotiques proposés dans le protocole à savoir Ampicilline, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, Gentamicine, Chloramphenicol et Cotrimoxazole ont été testés.

La résistance naturelle des Klebsielles aux aminopénicillines se trouvait confirmée par la résistance notée avec des antibiotiques tels que l'Ampicilline, la Gentamicine, le Cotrimoxazole et les aminosides.

La résistance est variable au ceftriaxone et au chloramphénicol. Seul 39,40% de nos souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été sensibles à la Ceftriaxone. Cette fréquence est inférieure à celle de SOUDE à Cotonou (48.7). [22].

Les souches restent sensibles à la Ciprofloxacin à 93,93% pour *Klebsiella pneumoniae* et 100% pour les autres souches, ce qui est supérieure aux 79,5% de SOUDE à Cotonou. [22].

Du point de vue socio- démographique :

Pendant la période d'étude, sur les 43 cas d'infections à Klebsiella, le sexe ratio est en faveur du sexe masculin soit 1,4.

La majorité des patients infectés soit 60,46% sont dans la tranche d'âge des nourrissons (de 1 mois à 3 ans).

Le devenir des cas d'infection à Klebsiella est variable selon les patients et cela malgré l'antibiothérapie. Nous avons noté 32,56% de décès et 37,21% d'évolution favorable . Les autres patients sont perdus de vue (27,91%).

Klebsiella et infections nosocomiales :

Les infections nosocomiales (IN) constituent un problème de santé publique. Elles causent une augmentation de la morbidité, de la mortalité, du séjour hospitalier et des frais de prise en charge des patients. [24]. Environ un million de patients meurent chaque année de ces infections nosocomiales. [25].

Selon les données de la littérature, au cours des infections nosocomiales en milieu pédiatrique tunisien: les bacilles à Gram négatif étaient les bactéries les plus fréquemment isolées (68%) et étaient dominés par *Klebsiella pneumoniae* (22,7%). Le germe prédominant des bactéries était *Klebsiella pneumoniae* (26,7%), multirésistant dans 85% des cas, [26].

Selon SANOGO, *Klebsiella pneumoniae* a été le germe le plus fréquent (soit 23,6%) des infections nosocomiales au service de réanimation du CHU Gabriel Touré en 2006. [27].

Pour SAMAKE en 2008 *Klebsiella* vient en 2^{ème} position avec une fréquence de 16,7% après *Escherichia coli* (44,5%) des infections nosocomiales au service de réanimation du CHU Gabriel Touré en 2008. [28] *Klebsiella pneumoniae*

représente 3,7% des infections nosocomiales en chirurgie pédiatrique au Mali. [29]

La même bactérie représente 24,5% des infections nosocomiales dans les infections de la plaie opératoire dans le service de chirurgie générale et pédiatriques de l'hôpital Gabriel Touré dans la série de DOLO. [30]

6- CONCLUSION :

Au terme de notre étude portant sur la fréquence d'isolement des Klebsiella au laboratoire chez les enfants admis dans le service, nous avons isolé 43 Klebsiella soit une fréquence de 0,76%, le sexe ratio est en faveur du sexe masculin soit 1,4.

On observe une résistance du germe à la majorité des antibiotiques utilisés. Seule la ciprofloxacine est efficace sur les germes du genre Klebsiella avec une sensibilité à 94%. La majorité des patients sont des nourrissons (60,46% des patients infectés).

Nous déplorons 14 décès soit 32,56%.

Nous avons aussi noté que Klebsiella est une bactérie qu'on retrouve très souvent dans les infections nosocomiales.

7- RECOMMANDATIONS :

7.1. Aux personnels socio-sanitaires :

- Le respect strict des règles d'hygiène et d'asepsie à tous les niveaux.
- La réalisation d'un antibiogramme avant toute antibiothérapie si possible.
- La maîtrise des facteurs pouvant influencer sur la survenue des infections nosocomiales.
- L'usage des antibiotiques à bon escient.

7.2. Aux autorités :

- La création d'un comité national de lutte contre les infections nosocomiales.
- La création d'une unité de microbiologie (bactériologie et virologie) dans les hôpitaux.

7.3. A la population :

- Le respect des règles minimums d'hygiène.
- Le lavage des mains au savon ou avec tout autre antiseptique.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

[1]. **CISSE H.A.**, Evaluation du rôle de *Staphylococcus aureus* dans les infections bactériennes invasives à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire de l'hôpital Gabriel Touré, 2006, Thèse Pharm, N° 06-M-84, Bamako (Mali).

[2]. **RICHARD Cl. et GRIMONT F.** Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia, In : LE MINOR (L). Bactériologie médicale, Paris : Flammarion, 1992, 427-31p.

[3]. **LEON LE MINOR, MICHEL VERON**, Bactériologie Médicale 2^{ème} Edition Paris, 1989, 396- 795p.

[4]. **BALKISSA I.M.**, La prévalence des infections nosocomiales au CHU du Point G, 2007, Thèse Pharm. N° 07- P-52, Bamako (Mali).

[5]. **DUCA E., DUCA M., FURTUNESCU G.**, Microbiologie médicale, 2^e Ed. Didactique et pédagogique, Bucarest, 1979, 436p.

[6]. **FAUCHERE J.L., AVRIL J.L.**, Bactériologie générale et médicale Ellipses Edition marketing, 2002, 237- 53p.

[7]. **LECLERC H.**, Microbiologie générale, 2^e édition, 1983, 95p.

[8]. **SPICER J W.**, Pratique clinique en bactériologie, mycologie et parasitologie : Flammarion, 2000, 42-3p.

[9]. **FLANDROIS J.P.**, Bactériologie médicale, Collection Azay, Editions presses universitaires de Lyon, 1997, 198-200p.

[10]. **BERCHE P.**, Les staphylocoques, In : **BERCHE P, GAILLARD J.L** et **SIMONET M.** eds. Bactériologie : Les bactéries des infections humaines, Paris : Flammarion 1998, 267-77p.

[11]. **Bio Mérieux B.V.**, Bactériologie Mars 2003, Réf. 247003.

[12]. **BECTON, DICKINSON and Company**, BACTEC ®9050 Manuel d'utilisation, MA-0103, Révision : E Réf 445845, Septembre 2004.

[13]. **BECTON Dickinson**, Division DIAGNOSTIC VOTRE PARTENAIRE EN MICROBIOLOGIE.

[14]. Procédures et techniques de laboratoire d'analyses (protocoles approuvés) CVD-Mali.

[15]. **BIO-RAD PASTOREX™ MENINGITIS**, Juin 2006, Detection of soluble antigens and identification of *Neisseria meningitidis* A, C, Y/W135, *B/E. coli* K1, *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus B*.

[16]. **LE MINOR L., RICHARD C.**, Institut Pasteur Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries.

[17]. **CVD-MALI Surveillance 1000** : Infection bactérienne invasive chez les enfants recevant les soins en externe dans le département des urgences dans un centre pédiatrique de référence à Bamako, Mali.

[18]. **SAMAKE M.**, Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques, 2003, Thèse Pharm., Bamako (Mali), N° 109 f.

[19]. **SAMAKE T.**, Pratique de l'examen cyto bactériologique du liquide céphalorachidien au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques, 2003, Thèse Pharm., Bamako(MALI).

[20]. **OUOLOGUEM Y.**, Bilan de deux années d'hémoculture au laboratoire de Biologie Médicale du CHU du Point G, 2008, Thèse Pharm, Bamako (Mali) N° 93. 48p.

[21]. **YAO ATTEBY J.J., CISSE L., OREGA M., ATTIMERE Y., OULAI S., DJADAN M., ANDOH J.**, Infections néonatales à Abidjan (CHU de Treichville, RCI) aspects cliniques et étiologiques de Mars à Août 2000, Med. Afr. Noire 2006-53 (2), 124-26p.

[22]. **SOUDE S.G.A.**, Bactéries isolées des hémocultures au Centre National Hospitalier et Universitaire Hubert Koutoukou Maga de Cotonou (Bénin), 2005, Thèse Pharm., N° 05.P 84 Cotonou (Bénin).

[23]. **KI-ZERBO G., THIOUB B., DIOP B.M., BADIANE S., COLL-SECK A.M., SAMB A.**, Etude des hémocultures positives au CHU de Fann Dakar (Sénégal) : bilan de trois années du laboratoire de bactériologie, Med. Afr. Noire, 1996,43(6), 325-9p.

[24]. **RAKA L., ZOUTMAN D., MULLIQI G., KRASNIQI S., DEDUSHAJ I., RAKA N. et al.**, Prevalence of nosocomial infections in high-risk units in the University clinical center of Kosova (Serbie), *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006, 27, 421-23p.

[25]. Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales de l'interrégion Paris et Nord, Guide de définition des infections nosocomiales, Paris : C-CLIN Paris-Nort, 1995.

26]. **BEN JABLLAH N., BOUZIRI A., KCHAOU W., HAMDI A., MNIF K., BELHADJ S., KHALDI A., KAZDAGHLI K.**, Epidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne, *Med. Mal. inf* 2006, 36, 379-85p.

[27]. **SANOGO O.S.**, Infections nosocomiales en milieu de réanimation du CHU Gabriel TOURE, profil épidémiologique, clinique et bactériologiques, Thèse Med. N° 07-M-179, 2006, Bamako (Mali), 54p.

[28]. **SAMAKE S.B.**, Infections nosocomiales en milieu de réanimation du CHU Gabriel TOURE, profil épidémiologique, clinique et bactériologiques, Thèse Med. N° 08-M-207, 2008, Bamako (Mali), 53p.

[29]. **TOGO A., COULIBALY Y., KEITA M., TRAORE A., KANTE L., DIAKITE I. et coll.**, Infections nosocomiales en chirurgie pédiatrique au Mali, *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2009, 6(22), 255-314p.

[30]. **DOLO I.D.**, Les infections de la plaie opératoire dans le service de chirurgie générale et pédiatrique de l'hôpital Gabriel Touré, Thèse Med. N°01-M-125, 2001, Bamako (Mali), 47p.

FICHE SIGNALÉTIQUE :

NOM : KONE Nom de jeune fille : DIALLO

PRENOMS : Koumba No de tel : (+223) 76174679

TITRE DE LA THESE : FREQUENCE D'ISOLEMENT DES KLEBSIELLA AU LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE CVD DU CHU Gabriel TOURE DE 2002 A 2007.

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2009-2010

PAYS D'ORIGINE : Mali

LIEU DE DEPOT : bibliothèque de la FMPOS.

SECTEUR D'INTERET : bactériologie, santé publique, infectiologie,
pédiatrie.

RESUME

Objectif :

Notre étude avait pour but de déterminer la fréquence à laquelle le genre Klebsiella était isolé au laboratoire CVD-Mali du CHU Gabriel TOURE, de déterminer les caractères sociodémographique des patients, de déterminer le devenir immédiat des patients, de dégager le profil antibiotique de Klebsiella et enfin déterminer le rôle de Klebsiella dans les infections nosocomiales.

Méthodologie :

Il s'agit d'une étude rétrospective sur cinq ans (de 2002 à 2007) prospective de un an (de 2006 à 2007) basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives chez les malades hospitalisés ou vues en consultation externes dans le service de pédiatrie.

Résultats :

Durant notre période d'étude il a été effectué 16 878 prélèvements d'hémoculture dont 3 505 cultures positives, 6 126 LCR dont 1 917 positif et 397 autres liquides biologique dont 216 positifs.

De tous ces prélèvements on a isolé 43 Klebsiella soit une fréquence de 0,76%. Le sexe ratio est en faveur du sexe masculin soit 1,4 fois. Nous avons déploré 32,56% de décès. La Ciprofloxacine est l'antibiotique efficace. Klebsiella est la bactérie type des infections nosocomiales.

Conclusion :

Les Klebsiella sont des bactéries très répandues dans la nature, résistant à la plupart des antibiotiques. Ces bactéries s'attaquent généralement aux personnes avec un système immunitaire déprimé comme les nourrissons.

Mots clés : infection nosocomial; Klebsiella ; Pédiatrie ; Antibiotique.

Signalling paper

NAME : Diallo

SURNAME : Koumba

TITLE OF THE THESIS: ISOLATION FREQUENCY OF KLEBSIELLA IN LABORATORY OF BACTERIOLOGY CVD OF CHU Gabriel TOURE FROM 2002 TO 2007.

MAINTAINING CITY: Bamako.

MAINTAINING YEAR: 2009-2010.

ORIGIN COUNTRY: Mali.

CENTER OF INTEREST: FMPOS library.

INTEREST SECTEUR: bacteriology, public health,
infectiology, pediatrics.

SUMMARY:

Objective:

The purpose of our study was to determine the frequency by which the type Klebsiella was isolated in CVD Mali laboratory of CHU Gabriel TOURE to determine the sociodemographic characters of the patients to determine their future and to clear the antibiotic profile of Klebsiella and the determine the role of to Klebsiella in the nosocomial infections.

Methodology:

Here we mean the retrospective of a five years study (from 2002 to 2007) and a one year prospective study (from 2006 to 2007) based on laboratory inspection of bacteria sicknesses to hospitalized patients or seen in extern consultations in pediatrics services.

Results:

During our period of studies 16 878 deduction of blood culture have been done in which 3 505 positive cultures 6 126 CSF(Cerebral Spinal Fluid) in which 1 917 positives and 397 others biologic liquids in which 216 positives. In all the deductions we have isolated 43 Klebsiella be it a frequency of 0,76%. The ratio sex is in favour of male sex be it 1,4 times. We have been sorry to notice 32,56% of death. Ciprofloxacin is the efficient antibiotics. Klebsiella is the bacteria of nosocomial infections.

Conclusion:

Klebsiella are the most spread bacterial in the nature, tough to most of the antibiotics. Generally these bacterias attacks adults with the same immuniser system depresses as babies alike.

Keys words: Nosocomial infection; Klebsiella; Pediatric; Antibiotic.

SERMENT DE GALIEN

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

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

d'exercer dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

de ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;

en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

JE LE JURE.