

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1 Cadre de l'étude : L'Hôpital Principal

L'Hôpital est situé sur la presqu'île de Dakar, dans la zone du plateau. Il se trouve en bordure de l'Anse Bernard et fait face à l'île de Gorée. Il couvre une superficie de huit hectares (FADIGA, 2008). Cette étude est réalisée au service de biologie de la fédération des laboratoires de l'Hôpital Principal de Dakar.

1.2 Type et durée d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective, transversale de type descriptive menée à Hôpital Principal de Dakar, sur une période de six mois allant du 1er février au 31 juillet 2018.

1.3 Population d'étude

Ont été inclus les patients internés dans l'Hôpital et d'autres venants de l'extérieur pour d'éventuels examens médicaux qu'on devait traiter en bactériologie.

1.3.1 Critères d'inclusion

Les prélèvements inclus dans cette étude, sont les produits pathologiques suspectés de contenir des micro-organismes dont leur identification devait se faire par le MALDI-TOF.

1.3.2 Critères de non inclusion

Les prélèvements dont les bulletins ont été mal renseignés ainsi que les doublons ont été exclus.

1.4 Matériel de traitement des produits pathologiques

Il s'agit du matériel destiné à l'isolement des colonies, des réactifs utilisés, du matériel nécessaire pour la conservation des souches et à l'identification par le MALDI-TOF.

➤ Isolement

- Le matériel utilisé pour l'isolement des colonies était composé de : (Voir Figure 4)

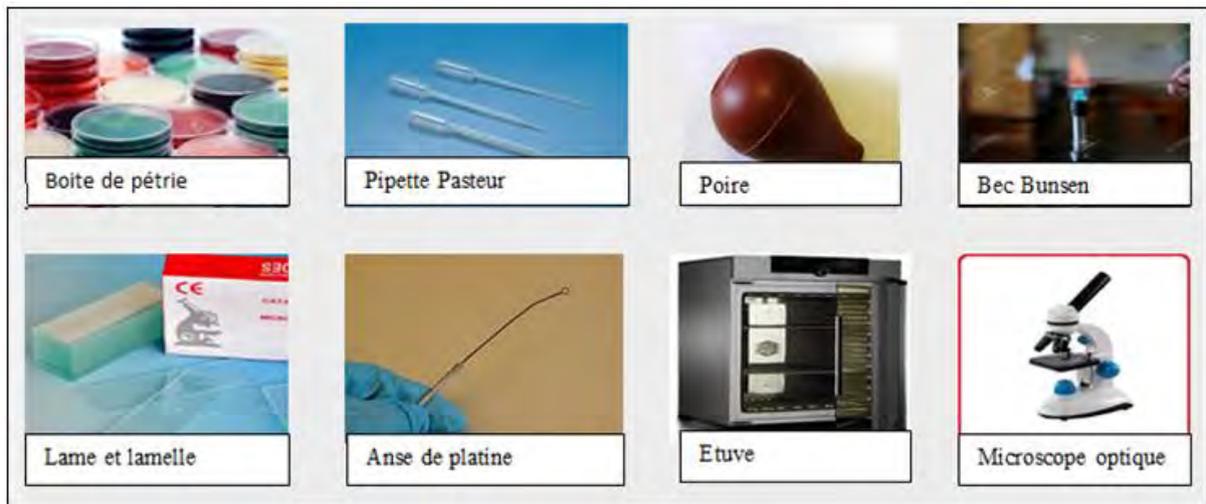


Figure 4 : Matériel pour isolement des colonies

- Les réactifs utilisés étaient les réactifs pour la coloration de Gram :
 - Violet de gentiane phéniqué
 - Solution iodo-iodurée de Lugol faible (liquide de Gram)
 - réactif de décoloration
 - Fuchsine de Ziehl phéniquée

➤ **Identification**

Pour l'identification des colonies par le MALDI-TOF le matériel suivant est nécessaire :

- Pipettes (0.1-3 μ l) et embouts (0.1-10 μ l)
- Anses jetables de 1 μ l
- Lames DS 48 puits (cibles)
- ECAL : *Escherichia coli* ATCC 8739 pour la calibration
- Acide formique 25%
- Matrice : CHCA (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique)
- Isolats à tester (Figure 5)



Figure 5 : Isolat de colonie bactérienne

1.5 Le Vitek MS

Le Vitek à l'Hôpital Principal de Dakar (voir Figure 6).



Figure 6 : Le VITEK MS et son système de pilotage

2. Méthodes

2.1 Prélèvements

Les prélèvements des patients hospitalisés sont effectués par les personnels des services cliniques. Ceux des patients suivis en externe sont réalisés au Centre Autonome des Prélèvements Externes (CAPE).

2.2 Traitement des produits pathologiques

La finalité de l'analyse bactériologique est l'isolement, puis l'identification et l'antibiogramme des bactéries potentiellement pathogènes. Pour se faire différentes étapes devront être suivies :

2.2.1 Examen macroscopique

Cet examen débute par une observation du produit pathologique à fin de noter l'aspect et la couleur de celui-ci.

2.2.2 Examen microscopique

Cet examen est constitué de deux étapes :

- **L'état frais** : il se fait entre lame et lamelle pour les produits pathologiques ne nécessitant pas une numération comme (pus, prélèvements vaginaux, selles...).

Si par contre une numération était exigée on utilisait les cellules de Kovac.

- **L'examen après coloration**

Cet examen consiste à effectuer des frottis séchés sur lame fixé avec de l'alcool.

Le colorant le plus utilisé est la coloration de Gram qui permet la distinction des bactéries (Gram+ ou Gram-) et le MGG pour faire la formule leucocytaire si nécessaire.

2.2.3 Culture et Isolement

La culture se fait sur des milieux de culture gélosés pour isoler les colonies que nous avons passés au MALDI-TOF. Ensuite les boîtes ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Le temps de culture était minimisé au maximum car cela nous a permis de faire notre analyse sur des colonies suffisamment développées sans que les cultures soient vieillissantes ou que les géloses soient desséchées.

2.2.4 Lecture et interprétation des cultures

La lecture se fait par l'observation des boîtes à l'œil nu pour mettre en évidence les caractères cultureux et morphologiques des colonies comme : la couleur, aspect, forme, taille et même l'odeur. Mais également la pureté des colonies isolées.

2.3 Identification des pathogènes par le Vitek MS

L'identification des microorganismes se faisait à partir de colonies isolées sur les différents milieux gélosés. Nous avons préféré travailler sur des colonies jeunes, au moins sur des cultures de 24 heures.

2.3.1 Mode opératoire

La calibration se fait à l'aide d'une souche d'*Escherichia coli* ATCC 8739. Cette souche est stockée au congélateur à une température de -80°C. Les explications et détails sont décrits en Annexe 2.

Le MALDI TOF peut fonctionner selon deux modes :

- Le mode IVD (in vitro diagnosis) : calibré pour la routine et exigeant une bonne identification de la souche de référence pour identifier les germes à tester. C'est une base de données non modifiable qui contient les spectres d'environ 800 espèces bactériennes et fongiques.
- Le mode RUO avec une base de données prolongée (SARAMISTM [v4.09] : destiné à la recherche et n'exigeant pas l'identification de souche calibrant pour donner des résultats (FALL *et al.*, 2015).

2.3.2 Préparation des échantillons

La spectrométrie de masse (Vitek MS de Biomerieux) que dispose, l'Hôpital Principal de Dakar, fonctionne avec des plaques métalliques (réutilisables ou jetables) et présentent 48 puits de dépôt. Ainsi il a besoin de trois ordinateurs relié à un réseau que sont les suivant :

- **La Prep-Station** : la préparation des échantillons se fait à partir de la Prep Station (Figure 7) .C'est un module constitué d'un ordinateur et d'un scanner optique servant à introduire les différentes données des échantillons (NLAB, bactérie, levure) et leur emplacement sur la lame.
- **Le deuxième ordinateur** est lié à l'appareil, et il sert à piloter le MALDI-TOF.
- **Le troisième ordinateur** est la base de données des spectres connus qui sert à faire la correspondance avec le spectre obtenu à partir du MALDI-TOF.

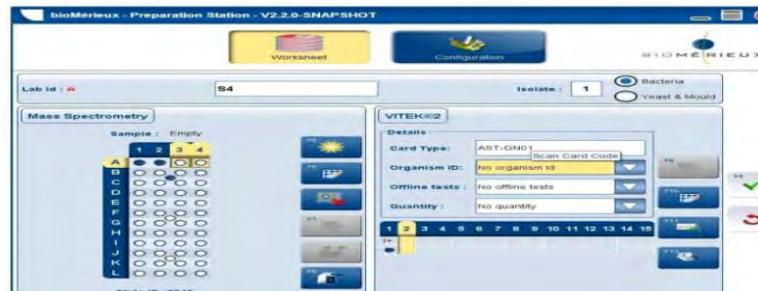


Figure 7 : La Prep Station

2.3.3 Traitement des échantillons

- À l'aide d'une anse calibrée de 1 µl, prélever une colonie à tester et la déposer sur les puits cibles.
- Tester l'échantillon en double.
- Sur les 2 dépôts, ajouter 1µl de matrice CHCA qui va permettre l'ionisation de l'échantillon.
- Pour les levures, déposer l'échantillon et traiter avec 0.5 µl d'acide formique.
- Laisser sécher, puis ajouter 1µl de matrice.
- Pour la calibration, faire un dépôt avec la souche *Escherichia coli* 8739 dans le puits prévu à cet effet, puis déposer 1µl de matrice.
- Indiquer les emplacements de chaque échantillon sur la lame en spécifiant s'il s'agit de bactéries ou de levures car les spectres d'acquisition sont séparés dans deux bases de données différentes.
- Une fois la lame (Figure 8) terminée, transférer les données de la Prep Station vers le Vitek MS, placer la lame sur le porte-lame, l'introduire dans le Vitek MS et lancer l'analyse.
- L'automate réalise le vide dans la chambre d'analyse et il est alors possible de lancer la séquence d'identification.
- La Figure 9 montre les étapes de la préparation de l'échantillon.



Figure 8 : lame DS

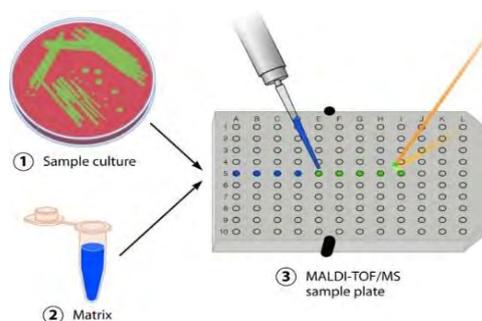


Figure 9 : Préparation de l'échantillon pour l'analyse en MALDI-TOF

2.3.4 Lecture et interprétation des résultats

Le calibreur est lu avant et après chaque série et le résultat doit être bon pour valider les résultats des échantillons soumis au système. Ainsi le logiciel MYLA® compare le spectre obtenu avec sa base de données et calcule un score de corrélation sur la réalisation de cent profil dont trente profils constituent le minimum acceptable pour réaliser la comparaison. Une fois l'analyse terminée le MS affiche les résultats dans le Lunch Pad sous forme de spots et indique le pourcentage d'identification. A la fin les résultats sont classés par famille, genre et espèce par le SARAMIS BASE Premium et le tout est récupéré sur des tableaux d'Excel afin de déterminer le pourcentage d'identification pour les différents germes.

Les résultats font intervenir deux paramètres : le degré de confiance ou score en pourcentage (Figure 10) et le niveau de confiance affiché par des icônes de formes et de couleurs différentes (Figure 11).

Score	Degré de confiance
99,9 à 60%	Bonne identification
<60%	Faible probabilité d'identification
Absence de pourcentage	Nombre de profils ou de pic insuffisants

Figure 10 : Tableau d'interprétation des résultats

niveau de confiance	icône
bonne	
à résoudre	
absence	

Figure 11 : Tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification

2.4 Traitement des données :

Les données sont traitées via le tableur Excel version 2013 et l'analyse des données par le logiciel Epi info7.