



UNIVERSITE DE BAMAKO

\*\*\*\*\*

Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Année Universitaire 2005 – 2006

Thèse N° \_\_\_\_\_/P

**FREQUENCE D'ISOLEMENT DES SOUCHES  
D'*Escherichia coli* AU LABORATOIRE DE L'HGT DE  
FEVRIER 2002 A DECEMBRE 2004**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le \_\_\_ / \_\_\_ / 2006

Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par Mr DEMBELE MAKANDIAN

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

**JURY**

Président	:	Professeur Ibrahim MAIGA
Membre	:	Docteur Mariam SYLLA
Codirecteur de thèse	:	Docteur Souleymane DIALLO
Directeur de thèse	:	Professeur Flabou BOUGOUDOGO

## LISTE DU PERSONNEL

### ADMINISTRATION :

Doyen : Anatole TOUNKARA - Professeur  
1<sup>er</sup> Assesseur : Drissa DIALLO - Maître de conférences agrégé  
2<sup>ème</sup> Assesseur : Sékou SIDIBE - Maître de conférences  
Secrétaire Principal : YENIMEGUE Albert DEMBELE - Maître de conférences agrégé  
Agent Comptable : Mme COULIBALY Fatoumata TALL - Contrôleur des Finances

### LES PROFESSEURS HONORAIRES :

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

### LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D E R & PAR GRADE :

#### D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALISTES CHIRURGICALES :

##### 1. PROFESSEURS :

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie - Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	O.R.L.
Mme SY Assitan SOW	Gynéco-Obstétrique
Mr Salif DIAKITE	Gynéco-Obstétrique
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie- Réanimation

## **2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :**

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophthalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr Mamadou TRAORE	Gynéco – Obstétrique

## **3. MAITRES DE CONFERENCES :**

Mr Filifing SISSOKO	Chirurgie Générale
Mr Sékou SIDIBE	Orthopédie Traumatologie
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie – Réanimation
Mr Tiéman COULIBALY	Orthopédie Traumatologie
Mme TRAORE J. THOMAS	Ophthalmologie
Mr Mamadou L. DIOMBANA	Stomatologie

## **4. MAITRES ASSISTANTS :**

Mme DIALLO Fatimata S DIABATE	Gynéco – Obstétrique
Mr Sadio YENA	Chirurgie Générale et Thoracique
Mr Issa DIARRA	Gynéco – Obstétrique
Mr Youssouf COULIBALY	Anesthésie – Réanimation
Mr Samba Karim TIMBO	ORL
Mme TOGOLA Fanta KONIPO	ORL
Mr Zimogo Zié SANOGO	Chirurgie Générale

## **5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE :**

Mme Diéneba DOUMBIA	Anesthésie/ Réanimation
Mr Nouhoum ONGOIBA	Anatomie & Chirurgie Générale
Mr Zanafon OUATTARA	Urologie
Mr Adama SANGARE	Orthopédie – Traumatologie
Mr Sanoussi BAMANI	Ophthalmologie
Mr Doulaye SACKO	Ophthalmologie
Mr Ibrahim ALWATA	Orthopédie – Traumatologie
Mr Lamine TRAORE	Ophthalmologie
Mr Mady MAKALOU	Orthopédie – Traumatologie
Mr Aly TEMBELY	Urologie
Mr Niani MOUNKORO	Gynécologie – Obstétrique
Mr Tiemoko D COULIBALY	Odontologie
Mr Souleymane TOGORA	Odontologie
Mr Mohamed KEITA	ORL

## **D.E.R DE SCIENCES FONDAMENTALES :**

### **1. PROFESSEURS :**

Mr Daouda DIALLO	Chimie Générale & Minérale
Mr Siné BAYO	Anatomie–Pathologie – Histo - embryologie
Mr Amadou DIALLO	Biologie
Mr Moussa HARAMA	Chimie Organique
Mr Ogobara DOUMBO	Parasitologie – Mycologie
Mr Yénimégué Albert DEMBELE	Chimie Organique
Mr Anatole TOUNKARA	Immunologie
Mr Bakary M CISSE	Biochimie
Mr Abdourahamane S MAIGA	Parasitologie
Mr Adama DIARRA	Physiologie
Mr Massa SANOGO	Chimie Analytique

### **2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :**

Mr Amadou TOURE	Histo - embryologie
Mr Flabou BOUGOUDOUGO	Bactériologie – Virologie
Mr Amagana DOLO	Parasitologie

### **3. MAITRES DE CONFERENCES :**

Mr Mamadou KONE	Physiologie
Mr Mahamadou CISSE	Biologie
Mr Sékou F. M. TRAORE	Entomologie médicale
Mr Abdoulaye DABO	Malacologie, Biologie Animale
Mr Ibrahim I. MAIGA	Bactériologie – Virologie

### **4. MAITRES ASSISTANTS :**

Mr Abdourahamane TOUNKARA	Biochimie
Mr Moussa Issa DIARRA	Biophysique
Mr Kaourou DOUCOURE	Biologie
Mr Bouréma KOURIBA	Immunologie
Mr Souleymane DIALLO	Bactériologie – Virologie
Mr Cheik Bougadari TRAORE	Anatomie – Pathologie
Mr Lassana DOUMBIA	Chimie Organique
Mr Mounirou BABY	Hématologie
Mr Mahamadou A. THERA	Parasitologie

## **5. ASSISTANTS :**

Mr Mangara M BAGAYOGO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Guimogo DOLO	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Abdoulaye TOURE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Djibril SANGARE	Entomologie Moléculaire Médicale
Mr Mouctar DIALLO	Biologie Parasitologie
Mr Boubacar TRAORE	Immunologie
Mr Bokary Y SACKO	Biochimie

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

### **1. PROFESSEURS :**

Mr Abdoulaye Ag RHALY	Médecine Interne
Mr Mamadou K TOURE	Cardiologie
Mr Mahamane MAIGA	Néphrologie
Mr Baba KOUMARE	Psychiatrie, <b>Chef de D.E.R</b>
Mr Moussa TRAORE	Neurologie
Mr Issa TRAORE	Radiologie
Mr Mamadou M KEITA	Pédiatrie
Mr Hamar A TRAORE	Médecine Interne
Mr Dapa Aly DIALLO	Hématologie
Mr Moussa Y MAIGA	Gastro – entérologie – Hépatologie
Mr Somita KEITA	Dermato – Léprologie

### **2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES :**

Mr Toumani SIDIBE	Pédiatrie
Mr Bah KEITA	Pneumo – Phtisiologie
Mr Boubacar DIALLO	Cardiologie
Mr Abdel Kader TRAORE	Médecine Interne
Mr Siaka SIDIBE	Radiologie
Mr Mamadou DEMBELE	Médecine Interne

### **3. MAITRES DE CONFERENCES :**

Mr Mamady KANE	Radiologie
Mr Saharé FONGORO	Néphrologie
Mr Bakoroba COULIBALY	Psychiatrie
Mr Bou DIAKITE	Psychiatrie
Mr Bougouzié SANOGO	Gastro – entérologie

#### **4. MAITRES ASSISTANTS :**

Mme Tatiana KEITA	Pédiatrie
Mme TRAORE Mariam SYLLA	Pédiatrie
Mr Adama D. KEITA	Radiologie
Mme SIDIBE Assa TRAORE	Endocrinologie
Mme Habibatou DIAWARA	Dermatologie
Mr Daouda K. MINTA	Maladies Infectieuses

#### **5. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE :**

Mr Kassoum SANOGO	Cardiologie
Mr Seydou DIAKITE	Cardiologie
Mr Mahamadou B CISSE	Pédiatrie
Mr Arouna TOGORA	Psychiatrie
Mme DIARRA Assétou SOUCKO	Médecine Interne
Mr Boubacar TOGO	Pédiatrie
Mr Mahamadou TOURE	Radiologie
Mr Idrissa A. CISSE	Dermatologie
Mr Mamadou B. DIARRA	Cardiologie
Mr Anselme KONATE	Hépatogastro-entérologie
Mr Moussa T. DIARRA	Hépatogastro-entérologie
Mr Souleymane DIALLO	Pneumologie
Mr Souleymane COULIBALY	Psychologie
Mr Sounkalo DAO	Maladies Infectieuses
Mr Cheick Oumar GUINTO	Neurologie

#### **D.E.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES :**

##### **1. PROFESSEURS :**

Mr Boubacar Sidiki CISSE	Toxicologie
Mr Gaoussou KANOUTE	Chimie analytique, Chef de D.E.R.

##### **2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES**

Mr Ousmane DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Mr Drissa DIALLO	Matières Médicales

##### **3. MAITRES DE CONFERENCES :**

Mr Boukassoum HAIDARA	Législation
Mr Elimane MARIKO	Pharmacologie
Mr Alou KEITA	Galénique

#### **4. MAITRES ASSISTANTS :**

Mr Benoît KOUMARE	Chimie Analytique
Mr Ababacar I MAIGA	Toxicologie
Mr Yaya KANE	Galénique
Mme Rokia SANOGO	Pharmacognosie

#### **5. ASSISTANTS :**

Mr Saïbou MAIGA	Législation
Mr Ousmane KOITA	Parasitologie Moléculaire

### **D.E.R DE SANTE PUBLIQUE :**

#### **1. PROFESSEURS :**

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

#### **2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE :**

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

#### **3. MAITRES ASSISTANTS :**

Mr Bocar G TOURE	Santé Publique
Mr Adama DIAWARA	Santé Publique
Mr Hamadoun SANGHO	Santé Publique
Mr Massambou SACKO	Santé Publique
Mr Alassane A DICKO	Santé Publique

#### **4. ASSISTANTS :**

Mr Samba DIOP	Anthropologie Médicale
Mr Seydou DOUMBIA	Epidémiologie
Mr Oumar THIERO	Bio-statistique

## **CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES :**

Mr N'Golo DIARRA	Botanique
Mr Bouba DIARRA	Bactériologie
Mr Salikou SANOGO	Physique
Mr Boubacar KANTE	Galénique
Mr Souleymane GUINDO	Gestion
Mme DEMBELE Sira DIARRA	Mathématiques
Mr Modibo DIARRA	Nutrition
Mme MAIGA Fatoumata SOKONA	Hygiène du Milieu
Mr Mahamadou TRAORE	Génétique
Mr Yaya COULIBALY	Législation
Mr Lassine SIDIBE	Chimie Organique

## **ENSEIGNANTS EN MISSION :**

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



## **DEDICACES**

Je dédie ce modeste travail :

**A DIEU**

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

Amen

A son Prophète MOHAMED paix et salut sur lui.

**A mon père Ibrahim Dembélé.**

Tu es pour moi l'exemple inégalable de la rigueur, de la patience et de la justice. Tu m'as enseigné l'honneur, le respect de soi, d'autrui et le travail bien fait. Que Dieu te garde pendant longtemps à nos côtés et qu'il exhausse tes bénédictions.

**A ma mère Kadiatou Coulibaly**

Pour ton amour, ton encouragements constants ainsi que tes prières et bénédictions. Ce travail est le modeste témoignage de toute mon affection et de mon profond respect. Que Dieu le tout puissant vous garde encore longtemps auprès de nous pour que vous puissiez profiter du fruit de nos efforts.

**A mes frères et soeurs**

Votre soutien ne m'a jamais fait défaut. Que les liens fraternels se resserrent davantage.

**A ma grand-mère paternelle**

Merci, que Dieu te bénisse et t'accorde une bonne santé

**A mes oncles et tantes**

En reconnaissance de votre amour et de votre soutien moral, je vous exprime toute ma gratitude.

Vos conseils avisés m'ont conduit jusqu'au bout de ce travail.

**A mes cousins et cousines, neveux et nièces**

Que ce travail soit l'occasion de vous exprimer ma profonde affection. Merci pour votre soutien

**A la "famille"**

**« Plusieurs personnes entreront ou sortiront de ta vie mais  
seulement les vrais amis laisseront une empreinte dans ton cœur »**

Dr Abdou Sow, Dr Abdramane Berthe, Aphady Cisse, Modibo Sadessi, Cheik F Daibate, Cheik Diallo Tiemoko Kante, Lamine Keita Seydou Dr Ali Diallo Dr Djibril Coulibaly Dr Ladji Dembele

**AUX DOCTEURS**

Keita Aoua Keita, Youssouf Fofana, Samba Sangare, Tenin Samake, Mariam Samake, Aliou Toure, Mamadou Sylla

**A vous les enfants malades du monde**

Que Dieu vous donne la santé

## **REMERCIEMENTS**

## **A ma promotion**

Merci pour tout

## **A nos partenaires Américains**

Monsieur le Professeur et Directeur CVD Baltimore Myron M. LEVINE MD, DTPH et son équipe, particulièrement Karen L. KOTLOFF, MD, Patrick R. MURREY, MD, DTPH, James D CAMBELL, MD Milagritos D TAPIA, MD, pour les enseignements reçus des Standart Operating Procedures, les conseils pratiques prodigues, leur sympathie et leur sagesse.

A Docteur Samba O SOW, MD, MSc coordinateur CVD Mali et tout le personnel CVD.

A tout le personnel de l'hôpital Gabriel Touré et plus précisément celui du laboratoire d'analyses biomédicales pour sa disponibilité, sa sympathie.

A tous les étudiants (es) de la Faculté de Médecine, de pharmacien et d'Odontologie.

A toutes les personnes de bonne volonté de près ou de loin, qui ont contribué à la bonne réussite de ce travail, qu'elle en soit remerciée.

**A NOS EMINENTS MAITRES ET JUGES**

A notre Maître et président du jury

**Professeur Ibrahim I MAIGA**

Professeur agrégé de bactériologie virologie à la Faculté de Médecine de  
Pharmacie et d'Odontostomatologie

Chef de service du laboratoire de l'hôpital National du Point G

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

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

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

A notre Maître et juge

**Docteur Mariam SYLLA**

Médecin Spécialiste en Pédiatrie et en Réanimation Néonatalogie

**Maître assistant**

Chef du service de Réanimation néonatale de l'hôpital Gabriel Touré

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

Votre souci du travail bien fait, vos valeurs morales et scientifiques constituent à nos yeux une source d'inspiration. La courtoisie et l'esprit de collaboration qui vous animent nous ont beaucoup marqué

A notre Maître et co directeur  
Docteur Souleymane DIALLO  
Maître Assistant en bactériologie et virologie a la Faculté de Médecine de  
Pharmacie et d Odontostomatologie,

Chef de service du laboratoire de l hôpital Gabriel Touré,  
Colonel des forces Armées du Mali.

Cher Maître vous nous avez fait honneur en nous acceptant dans votre service.  
Au delà de vos qualités de pédagogue reconnues par tous, nous avons découvert  
en vous un homme plein de generosite, de simplicité, rigoureux dans le travail.  
Votre esprit scientifique ne cessera jamais d émerveiller tant vos collaborateurs  
que de nous, vos étudiants. Nous sommes très honores d être parmi vos élèves.  
Votre apport pour la réalisation de ce travail fut plus que considérable il est  
aussi le votre.

Tout en espérant continuer a apprendre dans votre école, recevez cher Maître l  
expression de notre profonde gratitude, de notre reconnaissance sincère.  
Nous vous réitérons tous nos remerciements

A notre Maitre et Directeur de these  
Professeur Flabou BOUGOUDOGO  
Maitre de conference agrege en Bacteriologie et Virologie a la Faculté de  
Médecine de Pharmacie et d Odontostomatologie,  
Directeur de l Institut National de Recherche en Sante Publique,  
Responsable des cours de bacteriologie et virologie a la Faculté de Médecine de  
Pharmacie et d Odontostomatologie.  
Vous avez accepte la realisation de cette these dans notre service.  
Vos remarques et suggestions ont sans doute contribue a l amelioration de la  
qualite de ce travail.  
Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maitre admire, permettez  
nous, cher maitre, de vous reiterer toute notre reconnaissance et veuillez trouver  
ici notre profond respect et nos sincere remerciements.

## ABREVIATIONS ET SIGLES

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- AM -10 : Ampicilline 10 µg
- ATCC : American Type Culture Collection
- βGAL : Béta-Galactosidase
- BGP : Bacille Gram Positif
- BGN : Bacille Gram Négatif
- C-30 : Chloramphénicol 30 µg
- CGPch : Cocci Gram Positif en Chaînette
- CGPgr : Cocci Gram Positif en grappe
- CGPpr : Cocci Gram Positif en paire
- CIP-5 : Ciprofloxacine 5 µg
- CIT : Citrate
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- CO<sub>2</sub> : Dioxyde de Carbone
- CoccoBGN : Cocco Bacille Gram Négatif
- CRO-30 : Céftriaxone 30 µg
- CVD : « Center for Vaccin Development »  
(Centre pour les Vaccins en Développement)
- DCGN : Diplocoque Gram Négatif
- E. coli : Escherichia coli
- EAEC : Escherichia coli Enteroaggregative
- EHEC : Escherichia coli Enterohemorragique
- EIEC : Escherichia coli Enteroinvasive
- ETEC : Escherichia coli Enterotoxinogene
- EPEC : Escherichia coli Enteropathogene
- FRU : Fructose
- GLU : Glucose

GM-10 : Gentamicine 10  $\mu\text{g}$   
H<sub>2</sub>S : Hydrogène Sulfureux  
INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique  
LCR : Liquide Cephalo-Rachdien  
LOS : Lipo- Oligo- Saccharide  
mg /L : Milligramme par Litre  
mm : Milli- mètre  
 $\mu\text{g}$  : Micro- gramme  
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucleoside  
NAD- P : Nicotinamide Adénine Dinucleoside- Phosphate  
NCTC : National Collection of Type Culture  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
ONPG : Ortho NitroPhenyl-BD-Galactopyranosydase  
TSA : « Trypticase Soja Agar »  
SXT : Trimethoprim sulfamethoxazole  
UI : Unité Internationale  
URE : Uréase  
° C : Degré Celsius  
% : Pourcent  
 $\geq$  : Supérieur ou égal

## **PLAN**

INTRODUCTION

OBJECTIFS

1. GENERALITES SUR ESCHERICHIA COLI

2. METHODOLOGIE

3. RESULTATS

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

5 .CONCLUSION

6. REFERENCES

# SOMMAIRE

INTRODUCTION-----	1
OBJECTIFS-----	3
1. GENERALITES-----	4
1.1. DEFINITION-----	4
1.2. HISTORIQUE-----	4
1.3. HABITAT-----	4
1.4. TAXONOMIE ET NOMENCLATURE-----	6
1.5. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES-----	6
1.5.1. MORPHOLOGIE-----	6
1.5.2. CARACTERES CULTURAUX-----	7
1.5.2.1. CONDITIONS DE CULTURE-----	7
1.5.2.2. MILIEUX DE CULTURE-----	7
1.5.2.2.1. MILIEU MAC CONKEY-----	7
1.5.2.5.2. GELOSE LACTOSEE DE DRIGALSKI-----	8
1.6. CARACTERES BIOCHIMIQUES-----	10
1.7. CARACTERES ANTIGENIQUES-----	10
1.7.1. ANTIGENES O-----	11
1.7.2. ANTIGENES DE SURFACE-----	12
1.7.3. ANTIGENES H-----	13
1.8. PHYSIOPATHOLOGIES ET MANIFESTATIONS CLINQUES-----	14
1.8.1. POUVOIR PATHOGENE NATUREL-----	14
1.8.1.1 INFECTION DE L'ARBRE URINAIRE-----	14
1.8.1.2. MENINGITES ET SEPTICEMIES-----	14
1.8.2. PHYSIOPATHOLOGIE-----	15

1.8.2.1. LES SYNDROMES DIARRHEIQUES-----	15
1.8.2.2. LES INFECTIONS URINAIRES-----	16
1.8.3. LES MANIFESTATIONS CLINIQUES-----	17
1.8.3.1. LES SYNDROMES DIARRHEIQUES-----	17
1.8.3.2. LES INFECTIONS URINAIRES-----	18
1.8.3.2.1. LES CYSTITES-----	18
1.8.3.2.2. LES PYELONEPHRITES AIGUES-----	19
1.8.3.3. LES SEPTICEMIES ET MENINGITES NEONATALES-----	20
1.8.3.4. LES AUTRES INFECTIONS-----	20
1.9. DIAGNOSTIQUE BIOLOGIQUE-----	21
1.10. EPIDEMIOLOGIE-----	23
1.11. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES-----	25
1.12. TRAITEMENT-----	26
1.12.1. INFECTIONS URINAIRES -----	26
1.12.2. INFECTIONS ENTERIQUES-----	26
2. METHODOLOGIE	
2.1. PRESENTATION DE LA METHODE	
2.2. CADRE D' ETUDE	
2.3. L' ETUDE	
2.3.1. TYPE D'ETUDE	
2.3.2. DUREE DE L' ETUDE	
2.3.3. CRITERES D'INCLUSION ET DE NON INCLUSION	
2.3.3.1. CRITERES D'INCLUSION	
2.3.3.2. CRITERES DE NON INCLUSION	

## 2.4. PROTOCOLE ET METHODE DE TRAVAIL DU LCR ET DES AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

### 2.4.1. TRAITEMENT DU LCR

### 2.4.2. TRAITEMENT DES AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

## 2.5. PROTOCOLE DE TECHNIQUE DES HEMOCULTURES

## 2.6. TECHNIQUE UTILISEES POUR L'IDENTIFICATION DES BACTERIES

### 2.6.1. COLORATION DE GRAM

### 2.6.2. TESTS BIOCHIMIQUES ET METABOLIQUES

#### 2.6.2.1. OXYDASE

#### 2.6.2.2. GALERIE API

### 2.6.3. TEST D'AGGLUTINATION

## 2.7. CONSERVATION DES CULTURES

## 2.8. TEST DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

## ELEMENTS DE L'ASSURANCE QUALITES

## 3. RESULTAT

### 3.1. CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES

### 3.2. FREQUENCE DES PRELEVEMENTS

### 3.3. GERMES IDENTIFIES À PARTIR DES PRELEVEMENTS

#### 3.3.1. *ESCHERICHIA COLI* DES PRELEVEMENTS

#### 3.3.2. PROFIL ANTIBIOTIQUE DES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI*

## 4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

## 5. CONCLUSION

1.

# INTRODUCTION



## INTRODUCTION

Au cours de ces dernières décennies, des progrès importants ont été faits dans la compréhension des mécanismes contribuant à la virulence de certains types d'*Escherichia coli* [10].

Certains sérotypes d'*Escherichia coli* (K1 en particulier) sont capables d'induire des infections néo-natales gravissimes. Ce sont des septicémies éventuellement compliquées de méningites. *Escherichia coli* est tenu pour responsable de près de 20 % des septicémies et 40 % des méningites du nouveau-né. Le pronostic de ces infections est redoutable du fait à la fois de la rapidité de l'évolution chez ces enfants au système immunitaire « immature » et de la difficulté à établir le diagnostic. Il s'agit d'une urgence médicale, car la mortalité, malgré le traitement antibiotique efficace, est estimée entre 20 et 40 %. Ces infections sont plus fréquentes chez les prématurés ou les enfants ayant eu un accouchement difficile et long. Parmi les complications, la plus grave est la ventriculite, à l'origine de décès, d'hydrocéphalies ou des séquelles neurologiques définitives.

Le syndrome clinique est souvent difficile à diagnostiquer du fait du caractère insidieux et souvent pauci symptomatique de l'infection (sommolence, anorexie, hyperexcitabilité...). C'est la pratique systématique des hémocultures et de la ponction lombaire qui permet de faire le diagnostic. Tout retard au diagnostic et au traitement antibiotique sera particulièrement grave pour le pronostic vital et neurologique.

C'est pourquoi le Centre pour le Développement des Vaccins du Mali, dès sa mise en place avec le concours du Centre pour le Développement des Vaccins (Center for Vaccine Development) de l'Université de Maryland aux USA, a initié une étude prospective depuis février 2002. Elle porte sur les infections bactériennes invasives survenant chez les enfants hospitalisés dans le service de



.....  
pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE. Ce travail porte sur le rôle des *Escherichia coli* comme bactéries invasives dans les pathologies diagnostiquées au laboratoire à partir des hémocultures et des liquides de ponction comme le LCR de février 2002 à décembre 2004

Pour cela, nous nous sommes fixés comme objectifs



## OBJECTIFS

### Objectif général

Evaluer le rôle des *Escherichia coli* dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire de l'hôpital Gabriel TOURE

### Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence des prélèvements des différents liquides biologiques ;
- Identifier les germes des prélèvements des différents liquides biologiques des sites habituellement stériles ;
- Déterminer la fréquence d'isolement des souches d'*Escherichia coli* dans les différents liquides biologiques ;
- Déterminer le profil antibiotique de *Escherichia coli*



# GENERALITES



## 1. GENERALITES

### 1.1. DEFINITION

*Escherichia coli* est un bacille Gram négatif de l'intestin et de l'environnement humain ou animal (tube digestif). Il est responsable d'infections spontanées des voies urinaires et de gastro-entérites, il est aussi responsable d'infections nosocomiales. C'est la bactérie pathogène la plus fréquemment retrouvée. Il a une tendance vers l'acquisition de résistance aux antibiotiques et est l'espèce type du groupe des *Enterobacteriaceae* ou entérobactéries [13]

### 1.2. HISTORIQUE

Théodore Escherich, en observant la fréquence des diarrhées néonatales, avait déjà posé la question de l'implication du colibacille dans les entérites. Après la deuxième guerre mondiale, les connaissances ont convergé pour établir le concept de virulence de certains *Escherichia coli*. Dans les années 1950, de nombreuses souches d'*Escherichia coli* ont été incriminées en tant qu'agent étiologique de diarrhées infantiles. On sait maintenant que certaines souches <<spécialisées>> d' *Escherichia coli* sont associées à des pathologies très diverses (y compris extra intestinales) tant chez l'homme que chez l'animal ; diarrhées, gastro-entérites, infections du tractus urinaire, méningites, septicémies, <<maladie des hamburgers>>, le syndrome hémolytique et urémique etc. Mis à part cela, la plupart des souches d' *Escherichia coli* sont bénéfiques et même essentielles [9]

### 1.3. HABITAT

*Escherichia coli* est un hôte normal de l'intestin : il représente près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte (flore sous-dominante car la flore dominante est réalisée à 90 % par une flore anaérobie) ; on peut les retrouver



.....  
également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux [1].

Le nouveau-né estensemencé lors de l'accouchement par contact avec la flore cutanée périnéale qui provient de la flore fécale. La flore buccale de l'enfant nouveau-né comporte régulièrement *Escherichia coli*, la colonisation rapide du tube digestif en découle [13]

Une dizaine de sérotypes coexistent normalement chez un même individu, mais cette flore subit fréquemment des fluctuations dans sa composition. Les malades hospitalisés acquièrent après quelques semaines les sérotypes spécifiques de l'institution. Les *Escherichia coli* n'existent pas normalement dans l'eau et le sol. Leur présence est un indicateur de contamination fécale [17]

#### 1.4. TAXONOMIE ET NOMENCLATURE

*Escherichia coli* appartient à la famille des Entérobactéries qui comprend plusieurs genres à savoir *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Hafnia*, *Proteus*, *Providencia*, *Yersinia* [2]. Le genre *Escherichia* comprend cinq espèces : *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, et *Escherichia blattae* [20]. Il existe plusieurs types de souches d'*Escherichia coli* que l'on retrouve en pathologie humaine qui représente une enterovirulence marquée. Il s'agit des *Escherichia coli* entéropathogènes, *Escherichia coli* entéroinvasifs, *Escherichia coli* entérohemorragique, *Escherichia coli* entérotoxigène, *Escherichia coli* entéroaggrégatif, *Escherichia coli* entéroadhesif [2].



.....  
**1.5. CARACTERES BACTERIOLOGIQUES**

**1.5.1. Morphologie**

Les *Escherichia coli* sont des bacilles à Gram négatif, qui peuvent être mobiles ou immobiles, parfois capsulés [1]. Ils sont mobiles par cils peritriches. Ils peuvent posséder des pili communs appelés aussi fimbriae ; ce sont des filaments très courts qui recouvrent la surface des cellules et qui leurs confèrent des propriétés hémagglutinantes et, dans certains cas, des propriétés d'adhésion aux cellules animales [14]

**1.5.2. CARACTERES CULTURAUX**

**1.5.2.1. Conditions de culture**

La culture d' *Escherichia coli* est très facile avec une grande tolérance de variation de pH, pH optimum 7,5 température optimum : 37 °C mais pousse entre 15 °C et 45 °C. Il résiste bien à la chaleur : incubé à 45 °C il fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz [29]

**1.5.2.2. Milieux de culture**

**1.5.2.2.1. Milieu Mac Conkey [18]**

C'est un milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram négatifs *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques

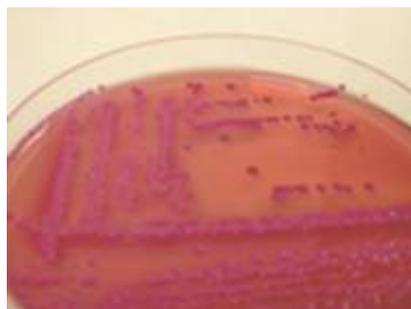


Aspect du milieu avant utilisation

C'est un milieu qui contient deux inhibiteurs de la flore Gram positive

- les sels biliaires
- le cristal violet

Les colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur du à la précipitation des sels biliaires sont lactose +



Aspect du milieu après utilisation

### 1.5.2.2.2. Gélose lactosée de DRIGALSKI

Ce milieu permet d'inhiber la culture des bactéries à Gram positif. Ce milieu est utilisé pour isoler les Entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non exigeants. Il permet la différenciation en colonie lactose positif et lactose négatif [15].

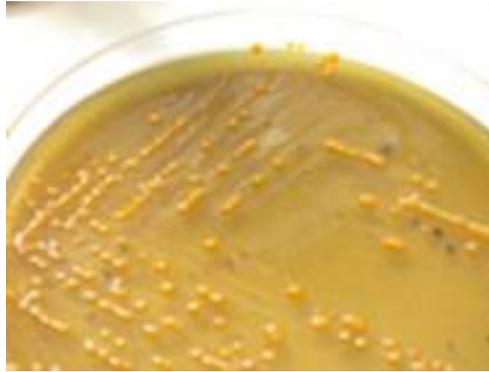


Aspect du milieu avant utilisation

Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram positif

- le desoxycholate de sodium
- le cristal violet

Les colonies des bactéries lactose + sont jaunes.



Aspect du milieu après utilisation [18]

## 1.6. CARACTERES BIOCHIMIQUES [17]

Ces bactéries sont identifiées par des tests biochimiques suivants :

- gaz en glucose +, en général
- lactose, mannitol, sorbitol +, en général
- betagalactosidase +, sauf très rare exceptions ;
- indole + ;
- phenylalanine-desaminase, urease, gelatinase, KCN, malonate, adonitol, inositol, H<sub>2</sub>S, citrate de Simmons -
- rouge de méthyle +, Voges-Proskauer –

La plupart des souches poussent sur milieu synthétique minimum



## 1.7. CARACTERES ANTIGENIQUES [11]

L'étude de cette structure antigénique est très utile car certains sérotypes ont un pouvoir pathogène particulier. KAUFMAN a distingué trois variétés d'antigène, O, H, K. :

- L'antigène O, somatique, thermostable ;
- l'antigène H, flagellaire présent chez *les Escherichia coli* mobile ;
- l'antigène K, qui groupe trois variétés d'antigène de surface :
  - l'antigène L, d'enveloppe thermolabile, qui possède une activité hémolytique et nécrotique ;
  - l'antigène A, capsulaire thermostable ;
  - l'antigène B, d'enveloppe ou de surface, thermolabile.

Ces travaux ont permis de préciser que le pouvoir pathogène d'une souche d'*Escherichia coli* dépend en partie de sa structure antigénique.

### 1.7. 1. Antigènes O

La structure du lipopolysaccharide des *Escherichia coli* est similaire à celle des *Salmonella*, les polysaccharides étant caractéristiques des spécificités. Toutefois, si chez les *Salmonella*, la structure du « core » paraît unique, plusieurs structures différentes existent chez les *Escherichia*.

La souche K12 qui a servi aux études fondamentales de la génétique des Entérobacteries est très particulière : elle a une structure du core qui lui est spéciale, un antigène très particulier (H48). Sa spécificité O est inconnue puisqu'elle est R.

La détermination de l'antigène O des *Escherichia coli* est, comme pour les *Salmonella*, la première étape de l'étude antigénique. Mais elle est d'emblée plutôt compliquée puisque le facteur O homologué porte le



.....  
numéro 163, alors que chez les *Salmonella*, 42 groupes O et 9 sous-groupes sont connus. Dans la sérologie des *Escherichia coli* un antigène O est désigné par un seul facteur.

Les dix groupes O les plus fréquents dans les souches d'hémoculture sont O : 2 - 4 - 6 - 75 - 9 - 8 - 18 - 7 - 22 - 1.

Les mêmes groupes O sont les plus fréquents dans l'intestin normal et dans les infections urinaires, avec quelques variantes en fonction du pays où est faite l'étude. Ceci a permis de constater que les malades hospitalisés acquièrent les sérogroupes spécifiques de l'institution peu de jours après leur hospitalisation.

### 1.7.2. Antigènes de surface

**Les antigènes polysaccharidiques**, la plupart sont acides. Un groupe, associé aux antigènes O : 8 – 9 – 20 – 101 codé par un locus proche d'histidine rassemble des antigènes semblables à ceux des *Klebsiella*. Les souches qui les possèdent, cultivent sous forme de colonies mucoïdes et leur antigène O ne devient agglutinable qu'après un chauffage à 120 °C. Ces antigènes sont ceux décrits sous le nom de K de type A. un autre groupe est déterminé par un locus proche de sérine A. les antigènes les plus fréquents de ce groupe sont K 1 – 2 – 5 – 12 – 13. Si 80 antigènes K de ce type ont été homologués, on ne trouve qu'un nombre limité de combinaisons O K alors que théoriquement toutes les combinaisons seraient possibles.

Comme il est habituel dans le monde bactérien, les souches capsulées sont plus virulentes et moins aisément phagocytées que leurs variantes non capsulées. Les antigènes antérieurement appelés B sont supprimés parce qu'il a toujours été impossible de préparer les anticorps correspondants, sans spécificité O.



.....  
L'identification de ces antigènes K peut être faite par agglutination ou immuno-électrophorèse. L'électrophorèse en gel associée à la précipitation par le Cetavlon® paraît une bonne méthode pour savoir si une culture possède ou non un antigène K polysaccharidique.

**Les antigènes protéiniques**, constitués de fimbriae ou pili, appartiennent à trois groupes dont les deux premiers confèrent aux bactéries des propriétés adhésives et hémagglutinantes.

Les pili sexuels codés par des plasmides, bien qu'eux aussi des natures protéiniques, sont très peu nombreux par bactérie et leur production est actuellement réprimée.

**L'antigène M**, est ainsi désigné parce qu'on le trouve chez des *Escherichia coli* cultivant sous forme de colonies mucoïdes. Il est constitué d'acide cholanique et on le trouve dans des genres divers d' *Enterobacteriaceae*.

### **1.7.3. Antigènes H**

Les *Escherichia coli* étant souvent peu mobiles à l'isolement, il sera nécessaire de faire des passages en gélose molle pour sélectionner les bactéries les plus mobiles, donc les plus riches en antigène H. L'identification sera faite en tubes. Dans certains cas, il est nécessaire d'absorber les sérums qui présentent entre eux des réactions croisées. Actuellement 56 antigènes H différents sont connus [16].



## **1.8. PHYSIOPATHOLOGIE ET POUVOIR PATHOGENE NATUREL**

### **1.8.1 Pouvoir pathogène naturel**

#### **1.8.1.1. Infections de l'arbre urinaire et de la vésicule biliaire**

Les *Escherichia coli* sont les bactéries les plus fréquemment en cause dans les infections de l'arbre urinaire et de la vésicule biliaire. La contamination des urines, normalement stériles, se fait le plus souvent par voies ascendantes. On retrouve dans les urines les souches d' *Escherichia coli* qui ont les mêmes marqueurs (biochimiques, antigéniques, sensibilités aux antibiotiques) que celles isolées des matières fécales. Une autre voie possible est la voie lymphatique qui constituerait un relais entre le colon et l'arbre urinaire. Il peut exister des facteurs de pathogénicité, rendant en particulier les bactéries aptes à adhérer aux cellules et à s'y multiplier [16].

#### **1.8.1.2. Méningites et septicémies**

Les méningites et septicémies à *Escherichia coli* se voient surtout chez le nourrisson. Rappelons la haute fréquence de souches possédant l'antigène K1 apparenté à l'antigène polysaccharidique des méningocoques B. D'autres parentés antigéniques sont remarquables : K92/méningocoque C, K7/*Streptococcus pneumoniae* 3, K100/*Haemophilus influenzae b* [16].



## 1.8.2. PHYSIOPATHOLOGIE

Au cours de ces dernières décennies, des progrès importants ont été faits dans la compréhension des mécanismes contribuant à la virulence de certains types d'*Escherichia coli*. Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont en cause selon les souches responsables et selon les pathologies engendrées [10].

### 1.8.2.1. Les syndromes diarrhéiques [25]

**Les souches entérotoxigènes : ECET (*Escherichia coli* entéro-toxinogène)**

(O1, O8, O15, O20, O25, O63, O78, O80, O115, O128, O139)

Ces souches sont responsables de la diarrhée des voyageurs ou turista et de syndromes diarrhéiques épidémiques dans les pays du tiers monde. Elles se fixent sur la muqueuse par des pili et élaborent des entérotoxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST). Ces facteurs de virulence sont codés par les plasmides.

**Les souches enteroinvasives : ECEI (*Escherichia coli* entéroinvasive)**

(O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152)

Ces souches (très voisines des Shigelles par leurs caractères biochimiques et antigéniques) sont responsables de syndrome dysentérique avec invasion de la muqueuse intestinale. Cette pathologie ressemble à celle causée par les Shigelles.

- **Les souches enterohémorragiques : ECEH (*Escherichia coli* entérohémorragique)** (O157 mais aussi O26 et O111)

Ces souches sont responsables de diarrhées sanglantes et colites hémorragiques liées à la production de toxines SLT. Le syndrome hémolytique et urémique serait probablement dû aux effets de cette cytotoxine sur l'endothélium des capillaires rénaux et sur les cellules circulantes (anémie hémolytique).



.....  
- **Les souches entéro-pathogènes : ECEP** (*Escherichia coli* entéro-pathogène)  
(O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142)

Ces souches sont responsables de gastro -entérites infantiles, selon un mécanisme physiopathologique imparfaitement élucidé. Ces souches adhèrent à la surface des enterocytes sans les envahir. Elles sont proches des souches entérohémorragiques (ECEH) car elles produisent les toxines SLT qui seraient responsables des lésions.

- **Les souches entéroagrégatives : ECEagg** (*Escherichia coli* entéro-agrégatif)  
Ces souches sont responsables de diarrhées aqueuses, glaireuses et persistantes de durée supérieure à 14 jours.

Ces souches adhèrent aux cellules intestinales en formant de véritables agrégats à leur surface. Elles entraînent une surproduction du mucus et forment un biofilm à la surface des enterocytes. Ces facteurs d'adhésion sont AAF/I et AAF/II.

- **Les souches à adhésion diffuses : ECAD** (*Escherichia coli* à adhésion diffuse)

Ces souches, tout d'abord classées avec les *Escherichia coli* entéro-pathogène, forment maintenant un groupe à part, du fait de leur phénotype d'adhésion particulier qui n'implique pas d'agrégats microbiens. Deux marqueurs caractérisent ces souches : l'antigène fibrillaire de surface F1845 associé à un fimbriae (pilus) et la protéine adhesin involved in diffuse adherence, AIDA-1

### 1.8.2.2. Les infections urinaires

L'infection urinaire est définie par une multiplication microbienne au sein des voies urinaires associée à une réaction inflammatoire locale [22]. Il est connu que les infections urinaires à colibacilles sont dues à la migration de ces germes du tube digestif vers l'arbre urinaire par voie ascendante. Des raisons anatomiques expliquent leur plus grande fréquence chez la femme mais toutes les causes de



.....  
stase (lithiase, prostatite, compression, grossesse, malformation) constituent des facteurs favorisants.

Cependant la contamination vésicale par le colibacille ne donne une infection urinaire et surtout une atteinte du parenchyme rénale, qu'avec certaines souches particulières capables d'adhérer aux cellules de l'arbre urinaire.

Les souches uropathogènes appartiennent plus fréquemment aux sérotypes O1 – 2 - 4 – 6 – 7 – 16 – 18 - 75 et K1- 2 – 3 – 12 - 13 qui possèdent des adhésines[8].

### **1.8.3. Les manifestations cliniques**

#### **1.8.3.1. Les syndromes diarrhéiques [4]**

Escherichia coli est l'une des causes majeures de diarrhées aiguës dans le monde. Cette bactérie entraîne encore une mortalité importante dans les pays en voie de développement. La diarrhée peut revêtir deux aspects cliniques principaux :

- **D'une part**, il peut s'agir d'un syndrome cholérique, avec diarrhée profuse, aqueuse << eau de riz >>. Cette diarrhée sans fièvre est souvent accompagnée de vomissement (Gastro- entérite) et dure en général quelques jours. Ce tableau illustre la classique diarrhée des voyageurs (<< Turista >> ).

Survenant chez le nourrisson, la maladie peut prendre un tour dramatique du fait de la déshydratation qu'elle entraîne

- **D'autre part**, on peut observer un syndrome dysentérique, avec fièvre, douleurs abdominales violentes, crampes, ténésmes. La diarrhée est glaireuse avec selles muco-sanglantes, parfois nettement hémorragique. A l'examen microscopique, les selles contiennent du mucus et de nombreux polynucléaires et hématies, témoins de la réaction inflammatoire du tube digestif.

L'évolution spontanée de ces diarrhées est en règle favorable si le malade est correctement réhydraté et, en quelques jours la guérison survient sans séquelles



.....  
· La colite entérite hémorragique récemment décrite est caractérisée par une diarrhée suivie dans les 48 heures de selles hémorragiques. La recto-sigmoidoscopie montre une muqueuse oedématiée et hémorragique avec parfois des ulcérations, évoquant une colite ischémique aigue. Si l'évolution est habituellement favorable une complication grave peut survenir chez certains enfants : le syndrome hémolytique et urémique, l'une des premières causes d'insuffisance rénale aigue chez l'enfant. Ce syndrome survient au décours de l'épisode infectieux et associe à l'insuffisance rénale aigue une thrombopénie et une anémie hémolytique. L'évolution est en général favorable.

### **1.8.3.2. Les infections urinaires [4]**

*Escherichia coli* est tenu pour responsable de 60 à 80% des infections des voies urinaires. Le plus souvent, il s'agit de cystites se traduisant par une dysurie, pollakiurie et une fièvre peu élevée. Les cystites sont souvent complètement asymptomatiques et évoluent habituellement de façon régressive en quelques jours. La réaction inflammatoire locale induit la présence de nombreux polynucléaires et hématies dans les urines. Cette infection basse peut parfois se propager au parenchyme rénal, déclenchant une pyélonéphrite aiguë avec douleurs lombaires, fièvre et frissons. Cette localisation est parfois pauci symptomatique et peut mettre en jeu le pronostic vital.

#### **1.8.3.2. 1. Les Cystites [5] :**

Ce sont des atteintes infectieuses de la paroi vésicale. Ces infections surviennent avec une grande fréquence chez la jeune femme, sans aucune anomalie préexistante du tractus urinaire. En effet, on estime que 10 à 20 % des femmes jeunes présentent au moins un épisode de cystite au cours de leur vie. Ces cystites sont presque toujours provoquées par des micros reflux mictionnels. La maladie entraîne une dysurie, une pollakiurie et des douleurs sus-hépatiques.



.....  
Ces signes peuvent être très insidieux et passer totalement inaperçus. L'infection vésicale est accompagnée d'une pyurie avec nombreux polynucléaires ( $\geq 10^5$ /ml) et une bactériurie significative ( $\geq 10^5$  / ml). Chez l'homme, les infections urinaires sont beaucoup plus rares et sont pratiquement toujours associées à une infection préexistante (obstacles lithiasiques ou cancers des voies urinaires, prostatites), à des antécédents de manipulations des voies urinaires (endoscopie, sondage...), ou à une maladie sous jacente (diabète, drépanocytose, goutte...).

Les germes retrouvés sont très généralement les entérobactéries avec *Escherichia coli* en tête.

#### **1.8.3.2. 2. Les pyélonéphrites aiguës\_[4]**

Ce sont des complications des cystites. Les bactéries gagnent par voie ascendante le parenchyme rénal, souvent à la faveur d'un reflux vésico-urétéral lié à un obstacle (lithiase, tumeur) ou d'une diminution du péristaltisme urétéro-vésical (grossesse, paraplégie...). L'atteinte rénale se traduit par des douleurs lombaires habituellement unilatérale avec fièvre, pyurie et souvent des signes de cystites. Les bactéries se multiplient dans le parenchyme rénal, donnant une nécrose suppurative pouvant évoluer vers l'apparition de multiples abcès rénaux. Cette infection peut être insidieuse et évoluer vers la pyélonéphrite chronique avec fibrose interstitielle et périglomerulaire, et formation d'infiltrats lymphoplasmocytaires disséminés dans le parenchyme rénal. Cela aboutit à la destruction progressive du rein et à une altération de la fonction rénale en cas d'atteinte bilatérale. Une complication particulière est la nécrose papillaire secondaire à une pyélonéphrite avec obstruction urinaire ou survenant sur des terrains particuliers (diabète, drépanocytose, utilisation abusive d'analgésiques). Les abcès péri néphrétiques peuvent aussi être secondaires à une obstruction des voies urinaires avec pyélonéphrite. On a une métastase infectieuse au cours d'une septicémie. Les abcès péri néphrétiques compliquant une pyélonéphrite apparaissent habituellement après deux semaines d'évolution infectieuse et se



.....  
présentent comme une pyélonéphrite aiguë avec fièvre et douleurs abdominales unilatérales.

### **1.8.3.3. Les septicémies et méningites néo-natales [4]**

Certains sérotypes d'*Escherichia coli* (K1 en particulier) sont capables d'induire des infections néonatales gravissimes. Ce sont des septicémies éventuellement compliquées de méningites. *Escherichia coli* est tenu responsable de près de 20 % des septicémies et de 40 % des méningites du nouveau-né.

Le pronostic de ces infections est redoutable du fait à la fois de la rapidité de l'évolution chez ces enfants au système immunitaire « immature » et de la difficulté à établir le diagnostic. Il s'agit d'une urgence médicale, car la mortalité, malgré le traitement antibiotique efficace, est estimée entre 20 et 40%. Ces infections sont plus fréquentes chez les prématurés ou les enfants ayant eu un accouchement difficile et long.

Le syndrome clinique est souvent difficile à diagnostiquer du fait du caractère insidieux et souvent pauci symptomatique de l'infection (sommolence, anorexie, hyperexcitabilité...). C'est la pratique systématique des hémocultures et de la ponction lombaire qui permet de faire le diagnostic. Tout retard au diagnostic et au traitement antibiotique sera particulièrement grave pour le pronostic vital et neurologique. Parmi les complications, la plus grave est le ventricule à l'origine de décès, d'hydrocéphalies ou de séquelles neurologiques définitives

### **1.8.3.4. Les autres infections [4]**

De nombreuses autres infections à *Escherichia coli* peuvent se rencontrer, certains localisées aux voies digestives (cholécystite, appendicite), d'autres aux voies génitales, aux voies respiratoires ou à la sphère oto-rhino-laryngologie, au péritoine et à la peau. Ces infections opportunistes causées par des souches de flore commensale sont souvent liées à une intervention chirurgicale, une manœuvre instrumentale, une malformation (urinaires,...) ou encore surviennent



.....  
chez des sujets immunodéprimés. Elles peuvent être le point de départ d'une dissémination hématogène.

Près de 50% des septicémies à bacilles gram négatif sont dues à *Escherichia coli*. Le point de départ est essentiellement uro-génital ou abdominal. Un choc endotoxinique est retrouvé dans environ 20% des cas. Le pronostic dépend de divers facteurs, notamment du terrain immunitaire de l'hôte, de la résistance aux antibiotiques de la souche et de la présence de métastases septiques (méningite, ostéo arthrite, pleurésie, abcès du poumon, endocardite...).

## **1.9. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE**

Le diagnostic des infections à *Escherichia coli* est un diagnostic bactériologique direct avec recherche du germe dans les prélèvements divers : urines, selles, sang, LCR, pus, liquide d'ascite etc.... par des techniques appropriées.

### **1.9.1. L'examen microscopique**

Il révèle la présence de bacilles à gram négatif (BGN) mais il arrive que la morphologie soit atypique.

### **1.9.2. La culture**

Elle se fait sur des milieux simples ou sur milieux lactosés avec indicateur coloré donnant lieu au développement de bacilles à Gram négatif, fermentant le lactose et possédant les caractères biochimiques qui caractérisent l'espèce.

On peut aussi utiliser les milieux liquides pour :

Le sang, les pus, les liquides de ponction sontensemencés sur milieux enrichis (flacons pour hémoculture, coeur-cervelle, Trypcase.....)

Les selles (coproculture) sontensemencées sur milieux sélectifs (milieux de Muller-Kauffman)



.....  
Après ensemencement, les divers milieux sont habituellement incubés dans une étuve ou une chambre chaude à 37°C, en atmosphère ambiante (culture aérobie) ou en l'absence d'oxygène (culture anaérobie en jarre plastique, par exemple).

Délai d'incubation : De très nombreuses espèces bactériennes cultivent après 18 à 24 H d'incubation à 37 °C.

Outre le délai d'obtention, les cultures sont examinées en notant la quantité de colonies obtenues de manière :

- Semi quantitative (rares, peu nombreuses, nombreuses, très nombreuses) pour les liquides de ponction, par exemple.
- Quantitative ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  ..../ml) pour les prélèvements urinaires et pulmonaires.

Les autres éléments pris en compte sont :

- la culture en aérobiose et/ou en anaérobiose,
- l'aspect des colonies, la taille, la bordure (lisse, rugueuse), la coloration, la présence d'une hémolyse (alpha, bêta, gamma).

### **1.9.3. Le sérotypage**

Le sérotypage n'est pratiqué que pour les souches entéro-pathogènes (EPEC) et pour les sérotypes O157 (EHEC) pour lesquelles il existe des sérums agglutinants spécifiques.

La mise en évidence des enterotoxines n'est pas facile. Les méthodes de détection par techniques immunologiques se font par l'étude de l'effet cytopathogène sur des cultures cellulaires ou par hybridation ADN/ADN et ne sont pas couramment pratiquées.

La recherche de l'antigène k1 dans le sérum, le LCR ou les urines du malade par agglutination de particules de latex sensibilisées permet un diagnostic rapide en particulier chez le nourrisson ou le nouveau-né infecté mais on observe une réaction croisée avec l'antigène des méningocoques du groupe B.



.....  
Le sérodiagnostic des infections à colibacilles n'est utile que dans les infections urinaires de l'enfant où la découverte d'anticorps (par agglutination ou par hémagglutination passive) fait craindre une "infection haute".

On peut révéler la présence d'adhésines grâce à leur pouvoir hémagglutinant sur les globules rouges humains ou animaux.

Le test de Sereny (l'instillation de la souche *d' Escherichia coli* sur l'œil d'un cobaye provoque une kérato-conjonctivite) et met en évidence les souches EIEC qui ressemblent aux *Shigella*.

Il est parfois demandé de rechercher sur les souches isolées d'infections urinaires des anticorps fixés sur les bactéries dont la présence signerait une infection haute, rénale ou pyélo-calicielle.[8]

## 1.10. EPIDEMIOLOGIE

Les souches bactériennes responsables d'entérite sont transmises par ingestion à partir de l'environnement (eau, aliment) contaminé par les selles de malades ou de porteurs. Les *Escherichia coli* enteropathogènes, responsables d'épidémie meurtrière de gastro-entérites infantiles entre 1950 et 1970, ont pratiquement disparu actuellement des pays occidentaux où l'on ne signale que quelques cas sporadiques. Cependant il existe actuellement des épidémies meurtrières à souches EPEC dans le tiers monde (Brésil) où ces bactéries sont un problème important de santé publique. Les souches ETEC sont répandues dans le tiers monde. C'est l'un des agents le plus souvent responsables des diarrhées du petit enfant, de diarrhées des voyageurs ou d'épidémies de toxi-infections alimentaires dans les pays occidentaux. Ces souches sont responsables de syndromes cholériques très graves, aux Indes notamment, où on les a décrites pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1960. Elles sont rarement rencontrées en France et sont surtout isolées chez les migrants ou des voyageurs. Les souches d'*Escherichia coli* enterohémorragiques (EHEC) sont à l'origine d'épidémies de diarrhée



.....  
hémorragique en Angleterre et aux USA et n'ont pas encore été isolées en France. Enfin les souches EIEC sont rares en occident et surtout rencontrées en Amérique du sud et au sud-est asiatique.

On estime que 10-20 % des femmes sont susceptibles de développer une infection urinaire pendant leur vie. Les pyélonéphrites seront causées dans 60 à 80 % des cas par des souches de *Escherichia coli* uropathogènes. De plus, 40% des méningites et septicémies néo-natales sont dues à des *Escherichia coli* K1 [4]. Cependant la méningite à *Escherichia coli* semble rare chez l'adulte [26].

Les infections urinaires, néo-natales, nosocomiales, trouvent surtout leur origine dans la flore endogène du tube digestif ou du tractus génital, mais peut être transmises d'un sujet à l'autre à partir du matériel contaminé [4].

## 1.11. RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Au début des années 50 les antibiogrammes pratiqués sur *Escherichia coli* faisaient la démonstration d'une sensibilité presque constante à la tétracycline et au chloramphénicol. Aujourd'hui, et malgré la multiplication des plasmides de résistance, le colibacille demeure relativement accessible à nos traitements [16]. Concernant la sensibilité des souches aux antibiotiques testés, il a été noté un taux de sensibilité supérieur à 95% à la ceftriaxone, à l'aztréonam, à la gentamicine et à la ciprofloxacine mais un taux de 49 % au cotrimoxazole [26]. Une grande majorité de souches produisent une céphalosporinase d'origine chromosomique mais, par chance, le gène est le plus souvent réprimé, de telle sorte qu'une majorité de souches, 75 à 90%, demeurent sensibles aux céphalosporines. Une résistance à l'ampicilline survient avec une fréquence variable selon le lieu géographique considéré et l'origine des malades ; elle provient de la sécrétion d'une beta-lactamase d'origine plasmidique dont il



.....  
existe au moins onze variétés différentes et dont au moins sept sont transférables à *Escherichia coli*. On peut aussi considérer qu'à l'exception de certains centres hospitaliers, la plus grande majorité des souches, au delà de 90% sont sensibles aux aminoglycosides de type gentamicine et tobramycine. L'association triméthoprime sulfaméthoxazole (TMP-SMX) inhibe également une très grande majorité de souches même si une proportion de celles-ci résistent au sulfaméthoxazole seul. Quant aux tétracyclines et au chloramphénicol leur niveau de résistance dépend beaucoup d'une pratique à l'autre mais, de toutes façons, ils ne peuvent être considérés comme un traitement de premier choix dans les infections à colibacille.

En pratique, un antibiogramme est requis avant d'établir le choix thérapeutique comme c'est la règle pour toutes les Entérobactéries. Dans le cas de souches sensibles, l'ampicilline se place au premier rang du fait de sa tolérance et ses propriétés bactéricides. Toutefois, dans le cas d'infections sévères, avant que l'on ne puisse disposer du résultat des épreuves de sensibilité, la gentamicine et la tobramycine demeurent les antimicrobiens préférés du fait de l'incidence moins élevée de résistance, quitte à modifier cette attitude par la suite. Les sulfamides et l'association TMP-SMX sont plutôt réservés dans les infections plus bénignes, en particulier les cystites [16].

*Escherichia coli* possède différents phénotypes de résistance liés à la production d'enzymes bêta lactamase. Parmi ces phénotypes, on peut citer les pénicillinases de bas niveau, les pénicillinases de haut niveau, et le phénotype G 15



## **I.12. TRAITEMENT.**

### **1.12.1. Infections urinaires**

Le traitement sera choisi en fonction de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, de leur concentration au niveau de l'arbre urinaire, de leur toxicité éventuelle pour le rein. Il devra être soigneusement suivi par des examens bactériologiques répétés des urines.

### **1.12.2. Infections entériques**

Les travaux coordonnés par l'OMS dans les pays en voie de développement ont montré que l'on peut traiter tous les cas de diarrhée aiguë quelle qu'en soit l'étiologie, et dans tous les groupes d'âge, par la seule administration par voie orale d'un liquide de réhydratation. Ce liquide est habituellement un mélange dosé de chlorure de sodium (3.5g), bicarbonate de soude (2.5 g), chlorure de potassium (1.5g), glucose (20 g), dissous dans 1 litre d'eau. Cette solution est absorbée par l'intestin grêle, même si la diarrhée est abondante. Ceci permet d'éviter les perfusions continues qui nécessitent un personnel qualifié et des conditions d'asepsie.

Les antibiotiques ne jouent pas le premier rôle dans cette thérapeutique, et leur emploi doit être limité aux cas graves. Leur choix sera conditionné par leur activité in vitro, leur concentration intestinale, leur toxicité [16].



# METHODOLOGIE



## 2. METHODOLOGIE

### 2.1. Présentation des méthodes

#### L'appareil BACTEC 9050 et les bouillons de culture

##### L'appareil BACTEC 9050

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

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 [6].

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

Un volume de 5 ml de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans les flacons d'hémoculture qui sont saisis dès que possible dans l'appareil pour

.....  
garantir son efficacité. Il s'agit d'une innovation par rapport à l'hémoculture classique qui demande un volume de 10 ml de sang.

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



Figure 1 :Bactec 9050



## Les bouillons de culture

Il existe 5 types de flacons Bactec :

- **BD Bactec<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> 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<sup>TM</sup> 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 [4].



Figure 2 : Flaçon BD Bactec<sup>TM</sup> PEDS PLUS/F



.....  
**Composition du bouillon BACTEC 9050**

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

Liste des composants :

(les pourcentages correspondent au poids par rapport au volume)

Eau traitée	40 ml
Bouillon digéré de soja- 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 %

## 2.2. LE CADRE D'ETUDE

Notre travail sur la démarche qualité a été réalisé dans le laboratoire de l'Hôpital Gabriel TOURE situé dans le centre commercial de Bamako. C'est l'ancien Dispensaire Central de Bamako, devenu le deuxième Hôpital National du pays et qui porte le nom d'un jeune étudiant malien en médecine mort à la tâche. Le



.....  
laboratoire actuel est l'ancienne pharmacie de l'hôpital réaménagée en laboratoire. Il comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde et un bureau du chef de service. La salle de prélèvements et celle de parasitologie sont annexées au bâtiment principal.

En février 2002 une partie du laboratoire a été aménagée pour les activités de bactériologie et équipée en conséquence avec :

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des anses;
- 3 automates d'hémocultures Bactec 9050 ;
- 1 incubateur à CO<sub>2</sub> pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO<sub>2</sub> pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20E ;
- 1 centrifugeuse ;
- 1 congélateur à - 80 °C pour la conservation des souches bactériennes
- 1 congélateur à -20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des disques d'identification (Optochine, Bacitracine) des facteurs de croissance des *Haemophilus* ;
- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs ;
- Des micro-ordinateurs avec un système de communication Internet ;
- 1 microscope Olympus CX31 ;
- 1 néphélomètre Mc Farland pour les mesures de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de KIRBY BAUER ;

De petits matériels divers, des consommables et un ravitaillement régulier en milieux de culture et réactifs permettent de réaliser les activités de bactériologie.

Le personnel comprend :

- un pharmacien biologiste ;
- un pharmacien ;
- des internes ;



- .....
- des assistants de biologie ;
  - des techniciens supérieurs ;
  - un personnel de surface.

Les techniciens de laboratoire sont répartis entre les différentes sections de biologie, dont deux de la section de bactériologie ont bénéficié d'un stage de formation à Baltimore (USA).

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisées par un Professeur de bactériologie- virologie actuellement Directeur de l'INRSP et un superviseur Professeur au CVD Baltimore (USA).

## **2.3. L'étude**

### **2.3. 1. Type d'étude**

Il s'agit d'une étude retrospective sur trois ans, basée sur la surveillance de laboratoire des cas de maladies bactériennes invasives chez les patients hospitalisés dans le service de pédiatrie.

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

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

### **2.3. 2. Durée de l'étude**

L'étude a été réalisée sur une période de 3 ans : de février 2002 à décembre 2004, couvrant les trois ans, toutes les saisons y comprises.

### **2.3. 3. Critères d'inclusion et de non inclusion**

#### **2.3. 3. 1. Critères d'inclusion**



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

- être âgé de moins de 17 ans,
- être hospitalisé dans le service de pédiatrie de l'HGT,
- avoir une température corporelle  $\geq 39$  °C à l'admission ;
- avoir une "suspicion d'infection bactérienne invasive" (SIBI) ;
- le consentement éclairé des parents est obligatoire pour les enfants inclus dans l'étude et en plus l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est sollicité

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

Ne prennent pas part à cette l'étude :

- le nouveau- né malade n'ayant jamais quitté l'HGT depuis sa naissance ;
- l'enfant âgé de 13 à 16 ans incapable ou refusant de donner tout consentement, pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- l'incapacité ou refus du parent ou de l'accompagnant du patient à donner un assentiment.

## **2.4. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques**

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

### **2.4.1. 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 étaient réalisés dans l'ordre suivant :

- Les boîtes de gélose sont identifiées (le numéro d'enregistrement, le type de prélèvement, la date de travail sont écrits) idem pour la lame devant recevoir le frottis ;
- Sur les géloses au sang de cheval et au chocolat 2 à 3 gouttes de LCR sont déposées puis les boîtes de gélose sont refermées. Laisser imbiber la gélose par le LCR pendant quelques minutes ;
- Une goutte de LCR était déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis;
- Après avoir laissé sécher le frottis, il était fixé par "chauffage" de la lame à l'incinérateur de la hotte pendant 5 secondes au maximum ;
- L'hémocytomètre de LCR (cellule de Kova) est rempli et ensuite laissé au repos pour le comptage cellulaire ;
- Puis les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur la gélose au sang de cheval ou de mouton ; la gélose chocolat et la gélose Mac Conkey, sont ensemencées. Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> en les renversant ;
- Les tests d'agglutination avec le sérum latex Pastorex meningitis kit sont ensuite réalisés, dont le principe est le suivant :

Les réactifs Slidex méningite, 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 ces réactifs contient:

- 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 [21].

- Procéder à la coloration de Gram ;
- Le reste du prélèvement de LCR est gardé dans le réfrigérateur pendant 5 jours.

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

Les résultats suivants sont 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.

"Une fiche de travail LCR" est préparée pour y enregistrer le nom du patient, le numéro de dossier et la date du prélèvement. Tous les résultats des tests sont enregistrés sur cette fiche de travail.



.....  
**2.4.1.1. Protocole de travail de la Culture du LCR**

- Les géloses au sang chocolat et Mac Conkey sont examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats sont enregistrés sur la fiche de travail.
- 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.

- Suivre les procédures d'identification pour les cultures positives.

**2.4.2. Traitement des autres liquides biologique**

Ils sont traités comme le LCR.

**2.5. Protocole de techniques des hémocultures positives**

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 :

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

Sont écrits sur chaque boîte le numéro du Bactec, 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 :

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

b. si des micro-organismes sont détectés, ne plus remettre la bouteille dans le Bactec 9050. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...);

4. Le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

5. si 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 CO<sub>2</sub>.

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 colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;



.....  
8. Si des cocci Gram-positifs sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :

- Enregistrer les résultats des tests des disques d'optochine et de bacitracine ainsi que le test de la catalase ;
- 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 ;
- Si le micro- organisme est catalase- négatif, bêta- hémolytique, et bacitracine- positif (inhibé par la bacitracine), enregistrer le micro- organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;
- Si 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 ;
- Si 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 ;
- Si 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 d'optochine est négatif ou non concluant, faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;



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

Si 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. Si 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 20E. Les *Enterobacteriaceae* (telles que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase-négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;

- 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 de 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 [19].

## **2.6. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries**

### **2.6. 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 auront 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, si non le spécimen se détache de la lame ;
  6. Recouvrir le frottis avec la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) pendant 30 à 40 secondes ;
  7. Verser la solution de Lugol de la lame et la rincer avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
  8. Goutte à goutte la solution de décolorant alcool- acétone est versée sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
  9. Immédiatement après, rincer la lame avec un faible jet d'eau. L'excès d'eau est égoutté ;

Note : Si la solution alcool- acétone reste trop longtemps sur la lame, les micro-organismes 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 coque 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 = *Streptocoques pneumoniae* ou Entérocoque

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 *Haemophilus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

## **2.6.2. Tests biochimiques et métaboliques**

### **2.6.2.1. 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 :

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

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

Interprétation :

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

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

Le test d'oxydase est très important pour l'identification des bactéries Gram-négatif. Les bactéries oxydase positives les plus connues sont *Neisseria*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*. Les bactéries oxydase négatives les plus



.....  
connues sont les *Enterobacteriaceae*, une grande famille de bactéries qui inclut, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* ...

### 2.6.2.2. Galerie API

Système d'identification API 20 E

#### Principe :

Le système d'identification API 20 E 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 qui sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant la nuit dans un incubateur en aérobiose, et ensuite interprétés.

#### Procédure :

- Préparation de la galerie
  - a. Placer le support plastique API sur la table et ajouter assez d'eau pour couvrir à peine le bas du support.
  - b. Retirer la galerie API 20 E de son paquet et le placer dans le support.
- Préparation de l'inoculum
  - a. Ouvrir une ampoule pour préparation de la suspension
    - Tenir l'ampoule dans une main avec le plastique blanc faisant face.
    - Placer le pouce sur la capsule blanche et la pousser vers le bas aussi loin que possible.
    - Placer le pouce sur la capsule et pousser ceci jusqu'à ce que l'ampoule à l'intérieur de la capsule soit cassée.
    - Retirer soigneusement la capsule et le bout de l'ampoule.



- .....
- b. En utilisant une anse prendre une seule colonie de la gélose au sang (pas sur la gélose de Mac Conkey) et faire une suspension de la colonie dans la solution pour la préparation de la suspension. Aucun grumeau des micro-organismes ne devrait être présent dans la suspension.
  - c. Ajuster l'inoculum à 0,5 Mc Farland standard.
  - d. En utilisant une pipette à sérum stérile, inoculer la galerie API 20 E
    - Les microtubes se composent d'un tube (partie au dessous du plastique clair) et la cupule (partie au dessus du microtube qui est ouverte et exposée).
    - Pour le CIT (microtube numéro 11), le VP (microtube numéro 10) et le GEL (microtube numéro 11), remplir seulement le tube. Ne pas remplir la cupule.
    - Ajouter l'huile minérale dans les cupules des cinq microtubes suivants : ADH (microtube numéro 2), LDC (microtube numéro 3), ODC (microtube numéro 4), H<sub>2</sub>S (microtube numéro 6) et UREE (microtube numéro 7).
  - Placer le couvercle sur support et incuber la galerie pendant 18 à 24 heures dans l'incubateur en aérobiose. Ne pas placer la galerie dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> (en anaérobiose).
  - Lecture de la galerie
    - a. Reporter le résultats de l'oxydase qui a été fait sur les colonies de la gélose au sang enregistrer ce résultat sur la feuille de résultat de l'API 20 E.
    - b. Enregistrer tous les résultats excepté ceux de TDA (microtube numéro 10).
    - c. Lorsque GLU (microtube numéro 12) et au moins 3 autres cupules sont positives, ajouter les réactifs suivants :



- .....
- Une goutte de la solution de chlorure ferrique au microtube TDA. Une coloration brun- foncée est un résultat positif. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.
  - Une goutte du réactif de Kovacs au microtube IND. Attendre 2 minutes. Une teinte rouge en cercle est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.
  - Une goutte d'hydroxyde de potassium (VP1) et une goutte du réactif VP2 (ou alpha- naphthol) au microtube de VP. Attendre 10 minutes. Une couleur rose est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat.
  - Deux gouttes d'acide sulfanilique et deux gouttes du réactif Dimethyl-1-Naphthylamine au microtube GLU. Attendre 3 minutes. Une couleur rouge est une réaction positive. Enregistrer-le sur la feuille de résultat (NO<sub>2</sub>).
  - Si le tube est négatif (jaune) ajouter une pincée de la poudre de zinc. Attendre 5 minutes. Si le tube reste jaune, le test de N<sub>2</sub> est positif. Enregistrer-le sur la feuille de résultat (N<sub>2</sub>). Si cette réaction tourne au rouge, elle est négative.
- d. Quand le microtube GLU est négatif et le nombre de tests positifs est moins de 3, Ne pas lire le test. Dans ce cas, la galerie API doit être incubée au moins 24 heures de plus. Si après ce temps, le microtube GLU reste encore négatif et le nombre de tests positifs reste encore inférieur à 3, alors le micro-organisme peut être notifié comme étant un bacille Gram négatif à Oxydase positive ou négative et l'échantillon doit être envoyé à l'université de Maryland pour identification. L'antibiogramme doit toujours être fait.
- Calculer le profil numérique.
    - a. Sur la feuille de résultat, les tests sont regroupés par groupe de 3. Des résultats positifs pour le premier microtube ont une valeur de 1 ; une valeur



- .....
- de 2 pour le deuxième microtube ; et une valeur de 4 pour le troisième microtube. Un résultat négatif a une valeur de 0.
- b. Les valeurs pour chaque groupe de trois réactions sont additionnées ensemble et peuvent être de 0 à 7.
  - c. Ceci est fait pour chacun des 7 groupes de trois réactions. Ceci forme un nombre à 7 chiffres.
  - d. L'identification du micro-organisme est alors effectuée par la recherche des 7 chiffres dans le catalogue de référence de l'API 20 E. Les 7 chiffres doivent correspondre exactement. Toute identification avec Acceptable, Bonne, Très Bonne ou Excellente peut être enregistrée. Des tests supplémentaires sont exigés si l'identification est faiblement discriminante ou a une faible probabilité.

Dans le cas où les 7 chiffres ne correspondent pas exactement, vérifier que la colonie est pure. Lorsque ceci est exact, reprendre la procédure d'identification de la galerie API comme résumé ci-dessus au début. Si malgré cela les 7 chiffres ne correspondent toujours pas exactement à un nombre du catalogue d'identification API, téléphoner au représentant API. Quand vous êtes incapable de joindre cette personne, le micro-organisme peut être notifié comme étant un bacille Gram négatif à Oxydase positive ou négative. Il faut le conserver et envoyé un échantillon à l'Université de Maryland pour identification <sup>[21]</sup>.

Par ensemencement d'une galerie biochimique adaptée:  
Identification de *Escherichia coli* par un ensemble de réactions du métabolisme intermédiaire avec la galerie commerciale API 20 E



Figure 3 : La galerie commerciale API 20 E

### 2.6.3. Tests immunologiques : Tests d'agglutination Slidex méningite Kit

#### Principe

Les réactifs Slidex méningite, 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 LCR.

#### Matériels :

Le coffret contient :

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



.....  
*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* groupe A, *Neisseria meningitidis* groupe B, *Neisseria meningitidis* groupe C.

Cartes jetables

Bâtonnets jetables

Mode opératoire :

- Traitement des liquides céphalo- rachidiens

Chauffer systématiquement les LCR à 100 °C pendant 5 minutes

Centrifuger 10 minutes à 2000 tours/ minutes, et récupérer le surnageant.

Le surnageant constitue l'extrait à tester.

- Méthodologie :

1- Amener les réactifs à une température ambiante comprise entre 18 et 25 °C.

2- Bien remettre en suspension les réactifs latex. Chasser les gouttes des réactifs retenues dans le compte- gouttes.

3- Déposer sur une carte, dans les emplacements prévus à cet effet, une goutte de chacun des latex.

4- A chacune des gouttes, ajouter 30 µl de surnageant de l'échantillon à tester.

5- Mélanger le contenu de chaque cercle, en utilisant toute la surface, à l'aide d'un bâtonnet (utiliser une extrémité propre de bâtonnet pour chaque cercle).

6- Imprimer à la carte un léger mouvement de rotation pendant 2 minutes maximum et lire sous éclairage normal sans utiliser de loupe.

- Lecture :



.....  
Réaction négative : suspension homogène.

Réaction positive : apparition d'une agglutination en moins de 2 minutes.

- Interprétation des résultats :

Une réaction positive avec l'un des réactifs latex témoigne de la présence dans le liquide biologique de l'antigène correspondant.

Une réaction positive avec le latex R<sub>4</sub> (*Neisseria meningitidis* groupe B/*Escherichia coli* K1), chez un nouveau-né ou un prématuré, traduit dans la majorité des cas la présence de *Escherichia coli* K1, chez un sujet plus âgé, elle traduit plus probablement la présence de *Neisseria meningitidis* B.

En cas d'apparition d'une agglutination en moins de 2 minutes avec deux réactifs latex ou plus, la réaction est ininterprétable.

## 2.7. Conservation des cultures pures [12]

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 ou à la température du laboratoire ou dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+ 4 °C).
3. Le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée,ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot,ensemencée par piqûre centrale.

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

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

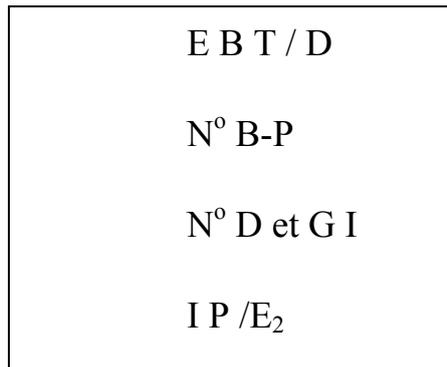
Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent sa mise en œuvre : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.



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

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

Chaque souche porte une étiquette d'identification.



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 /E<sub>2</sub> : initiale du patient /Etude 2

## **2.8. 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.

Matériels et réactifs utilisés :

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

Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)

Solution saline stérile à 0,85 ‰

Standard 0,5 de Mc Farland

Disques antibiotiques pour test de sensibilité

Ecouvillons en coton stériles

Pipettes à sérum

Pinces à disques et/ ou applicateur de disque

Conditions de stockage nécessaires :



- .....
1. milieux de culture (MHA- B et HTM) : A conserver au réfrigérateur, ils doivent être réchauffés à la température de la salle avant leur utilisation. Les boîtes non- stockées dans des sacs en plastique se déshydrateront et ne pourront pas être utilisées convenablement ;
  2. solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur ;
  3. standard 0,5 de Mc Farland : A conserver au noir dans un récipient. Ne pas utiliser de tube rayé. Le diamètre du tube doit être le même que celui des tubes de solution saline utilisés pour la préparation des tests d'inoculum ;
  4. disques d'antibiotiques : conserver les disques à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou à une température plus basse pour de longue conservation ;
  5. dès qu'une boîte est ouverte pour usage, elle peut être conservée au réfrigérateur dans une capsule bleue de 50 ml ensemble avec le dessiccateur.

Procédure du test :

1. les boîtes de gélose doivent être réchauffées à la température de la salle avant qu'elles ne soient inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais de gouttelette d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le micro-organisme ;
2. la gélose HTM (gélose spéciale) est utilisée pour les tests *Haemophilus*. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests ;
3. Enlever du réfrigérateur les disques pour le test de sensibilité afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle. Au paravent ils auront été enlevés du récipient de conservation. Il ne faut pas exposer les disques froids à l'air de la salle parce que la condensation de l'humidité sur les disques froids



.....  
conduirait à une détérioration rapide des antibiotiques. Vérifier les dates d'expiration sur les boîtes d'antibiotiques.

Ne pas utiliser de disques périmés ;

4. Sélectionner au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Toucher le sommet de chaque colonie avec une anse et nous les transférons dans un tube de solution saline. Ajuster l'inoculum de la solution saline à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de Mac Farland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté ;

5. Plonger un écouvillon stérile dans la suspension ajustée. Il est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au- dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. Inoculer la surface entière de la boîte de gélose en faisant tourner la boîte d'approximativement d'un angle de  $60^{\circ}$  et ensemençer de nouveau. Faire tourner la boîte et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;

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

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



.....  
Utiliser souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques ;

8. les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

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

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

c. pour *Haemophilus influenzae*: Ampicilline 10 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ;

d. pour les autres bacilles Gram négatif

I. boîte de gélose N°1- Ampicilline 10 µg, Céftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg.

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

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

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

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

Interprétation :

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



.....  
2. Mesurer les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte. Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins.

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

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

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

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

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

Compte-rendu :

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



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

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

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

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

## **2.9. Eléments de l'assurance qualité**

Les procédures suivantes sont suivis :

### **1. L'identification des spécimens**

### **2. L'enregistrement dans les registres de travail**

### **3. La saisie des résultats**

### **4. Le contrôle de qualité consistant en :**

#### **a. Le suivi des appareils**

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



.....  
. du congélateur de conservation des souches, intervalle de température - 65 à - 90 °C.

. du congélateur de conservation des antibiogrammes, intervalle de température - 20 à - 30 °C.

. des réfrigérateurs de conservation des réactifs et milieux de cultures, intervalle de température 2,8 à 8 °C.

. des automates Bactec.

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

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

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

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

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

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

- *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* A T C C 49619 ;
- *HAEMOPHILUS para- influenzae* A T C C 7901 ;
- *HAEMOPHILUS influenzae* A T C C 49247 ;
- *STREPTOCOCCUS* groupe B A T C C 12386 ;
- *STAPHYLOCOCCUS aureus* A T C C 25923 ;
- *STREPTOCOCCUS* groupe A A T C C 19615 ;
- *ESCHERICHIA coli* A T C C 25922

Il s'agit :



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



# RESULTATS



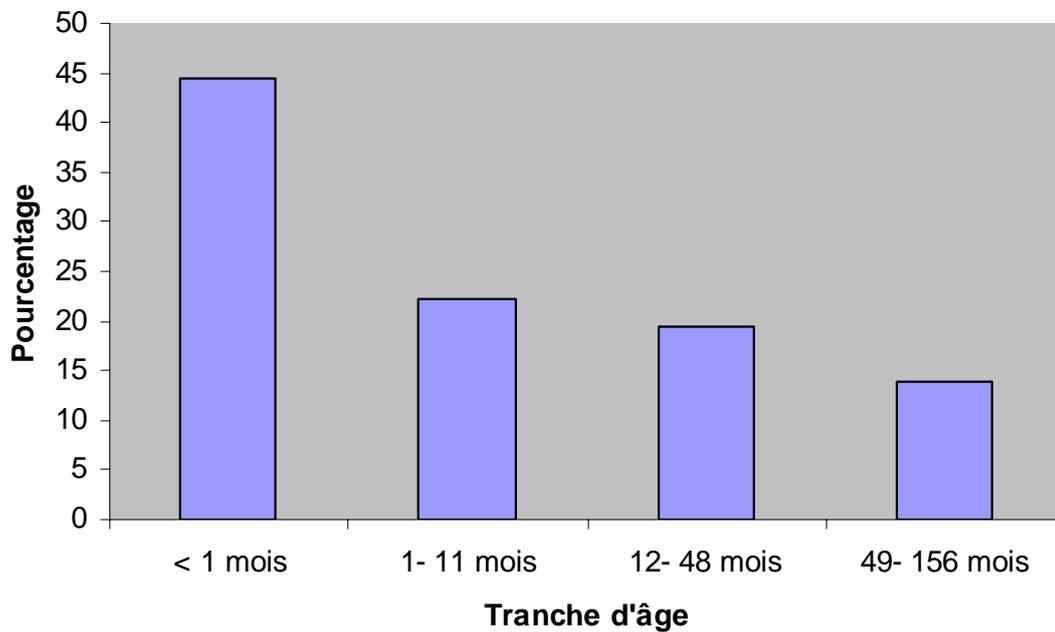
### 3. RESULTATS

- Seul le résultat de la culture finale a été pris en compte pour les germes.
- Les Bacilles Gram Positifs (BGP), STAPHYLOCOCCUS Coagulase Négative (SCN) les levures sont des contaminants.

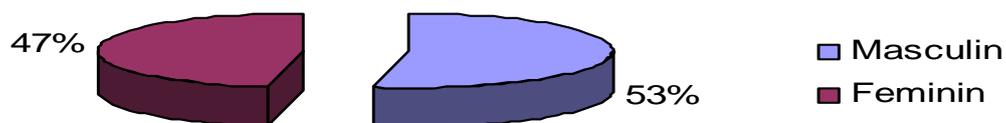
Les résultats sont présentés ainsi qu'il suit :

- Fréquence des prélèvements
- Germes identifiés dans les prélèvements
- Profil antibiotypque des souches d' *Escherichia coli*

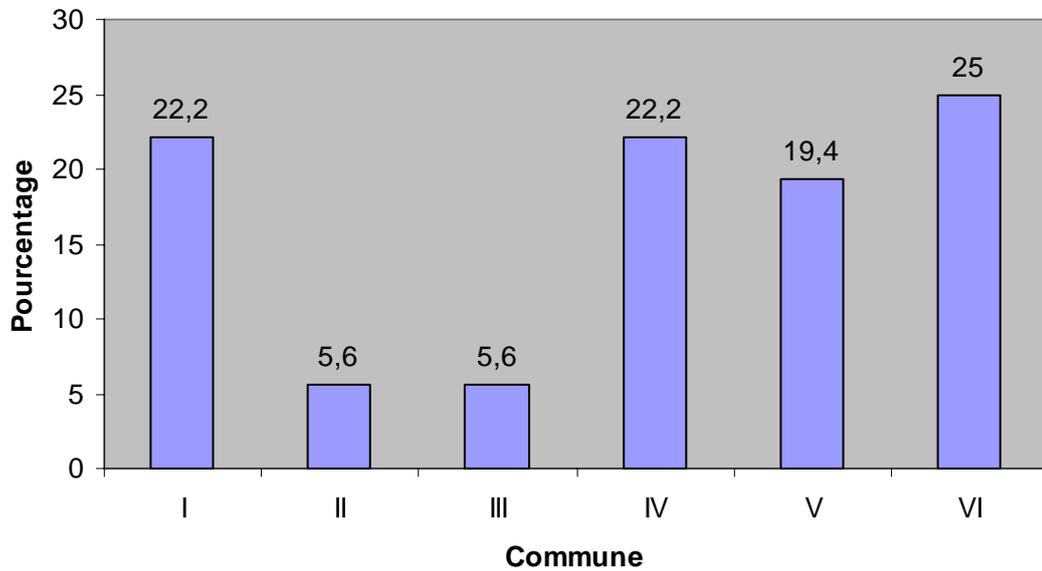
### 3.1. Caractéristiques sociaux démographiques



**Figure 4** : Répartition des patients selon la tranche d'âge  
La majorité de nos patients étaient des nouveau-nés.  
L'âge minimum était 3 jours et le maximum 15 ans.



**Figure 5** : Répartition des patients selon le sexe  
Le sexe masculin prédominait avec 52,8%.



**Figure 6** : Répartition des patients selon la résidence  
Les patients provenaient de toutes les communes



.....  
**3.2. Fréquence des prélèvements étudiés de 2002 à 2004**

**TABLEAU I : Total des prélèvements effectués de 2002 à 2004**

ANNEES	PRELEVEMENTS					
	Hémocultures		LCR		Autres liquides	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
2002	1978	36%	788	28,07%	47	30,92%
2003	1672	30,43%	981	34,95%	54	35,53%
2004	1844	33,56%	1038	36,98	51	33,55%
<b>Total</b>	<b>5494</b>	<b>100%</b>	<b>2807</b>	<b>100%</b>	<b>152</b>	<b>100%</b>

De 2002 à 2004 le nombre de prélèvements d'hémocultures de LCR et d'autres liquides biologiques se trouvent chaque année dans les mêmes proportions.



**TABLEAU : II** Résultat des cultures

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
Hémocultures	Bactec positif	Cultures avec germes	<b>1000</b>	18,20
		Cultures avec contaminants	476	8,66
		Cultures négatives	36	0,66
	Total			
	Bactec négatif	Cultures négatives	3982	72,48
<b>Total 1</b>			<b>5494</b>	<b>100,00</b>
LCR	Cultures positives	Cultures avec germes	<b>575</b>	20,48
		Cultures avec contaminants	840	29,93
	Cultures négatives	négative	1392	49,59
<b>Total 2</b>			<b>2807</b>	<b>100,00</b>
Autres liquides	Cultures positives	Cultures avec germes	<b>89</b>	58,55
		Cultures avec contaminants	16	10,53
	Cultures négatives	négative	47	30,92
<b>Total 3</b>			<b>152</b>	<b>100,00</b>
<b>TOTAL (1+2+3)</b>			<b>8453</b>	

Ce tableau montre les résultats positifs et négatifs de tous les types de prélèvements (sang pour hémoculture, LCR et tout autre liquide biologique).



### 3.3. Germes identifiés des prélèvements

TABLEAU III : Principaux germes isolés des hémocultures

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
<b>Total</b>	<b>1978</b>	<b>1672</b>	<b>1844</b>	<b>5494</b>	<b>100%</b>
<b>Résultats négatifs</b>	1471	1182	1329	<b>3982</b>	<b>72,48%</b>
<b>Résultats positifs</b>	507	490	515	<b>1512</b>	<b>27,52%</b>
<b>Nature des germes isolés</b>					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	78	100	115	<b>293</b>	<b>5,33</b>
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	12	99	122	<b>233</b>	<b>4,24</b>
<i>Salmonella</i> spp	60	48	39	<b>147</b>	<b>2,68</b>
<i>Salmonella</i> Typhi	74	20	13	<b>107</b>	<b>1,95</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	29	27	<b>79</b>	<b>1,44</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>17</b>	<b>08</b>	<b>17</b>	<b>42</b>	<b>0,76</b>
<b><i>Salmonella paratyphi B</i></b>	16	11	05	<b>32</b>	<b>0,58</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	03	05	<b>11</b>	<b>0,20</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	06	02	<b>11</b>	<b>0,20</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	02	08	01	<b>11</b>	<b>0,20</b>
<i>Streptococcus</i> non hémolytique	03	06	01	<b>10</b>	<b>0,18</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	01	04	04	<b>09</b>	<b>0,16</b>
<i>Streptococcus</i> groupe A	03	02	03	<b>08</b>	<b>0,15</b>
<i>Enterococcus</i> spp	01	01	05	<b>07</b>	<b>0,13</b>
<i>Streptococcus</i> groupe B	04	01	01	<b>06</b>	<b>0,10</b>
<i>Morganella morganii</i>	01	02	02	<b>05</b>	<b>0,09</b>
<i>Citrobacter species</i>	02	01	01	<b>04</b>	<b>0,07</b>
<i>Citrobacter freundii</i>	01	00	02	<b>03</b>	<b>0,05</b>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	01	<b>03</b>	<b>0,05</b>
<i>Salmonella arizonae</i>	01	01	01	<b>03</b>	<b>0,05</b>
<i>Salmonella paratyphi A</i>	00	01	01	<b>02</b>	<b>0,03</b>
<i>Pseudomonas putida</i>	00	01	01	<b>02</b>	<b>0,03</b>
<i>Salmonella paratyphi C</i>	01	00	01	<b>02</b>	<b>0,03</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	<b>02</b>	<b>0,03</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe C	00	00	01	<b>01</b>	<b>0,02</b>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	00	00	01	<b>01</b>	<b>0,02</b>
<b>Contaminants :</b>					
<i>Staphylococcus non aureus</i> (SNA)	143	119	123	<b>385</b>	<b>7,00</b>
Bacilles Gram Positif (BGP)	54	16	18	<b>88</b>	<b>1,60</b>
Levures	01	01	01	<b>03</b>	<b>0,05</b>

Ce tableau montre les principaux germes des hémocultures retrouvés dans les méningites et ou les septicémies.



TABLEAU IV : Principaux germes isolés du LCR

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
Résultats négatifs	385	485	522	1392	49,59%
Nature des germes :					
<i>HAEMOPHILUS influenzae</i> type b	52	75	87	214	7,62%
<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	45	68	77	190	6,77%
<i>SALMONELLA spp</i>	15	14	06	35	1,25%
<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe A	02	18	09	29	1,03%
<b><i>ESCHERICHIA coli</i></b>	<b>04</b>	<b>05</b>	<b>05</b>	<b>14</b>	<b>0,50%</b>
<i>NEISSERIA meningitidis</i> W135	00	08	06	14	0,50%
<i>SALMONELLA Typhi</i>	03	01	04	08	0,29%
<i>PROTEUS mirabilis</i>	01	04	03	08	0,29%
<i>STREPTOCOCCUS</i> non hémolytique	01	02	04	07	0,25%
<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	03	02	02	07	0,25%
<i>HAEMOPHILUS parainfluenzae</i>	05	01	01	07	0,25%
<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe B	01	01	03	05	0,18%
<i>SALMONELLA paratyphi</i> B	01	01	03	05	0,18%
<i>ENTEROCOCCUS spp</i>	01	02	01	04	0,14%
<i>KLEBSIELLA pneumoniae</i>	01	01	02	04	0,14%
<i>PSEUDOMONAS putida</i>	02	01	01	04	0,14%
<i>MORAXELLA specie</i>	01	01	01	03	0,11%
<i>KLEBSIELLA arizonae</i>	01	01	01	03	0,11%
<i>ACINETOBACTER calcovar</i>	00	01	02	03	0,11%
<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	00	01	01	02	0,07%
<i>ENTEROBACTER agglumerans</i>	00	01	01	02	0,07%
<i>CITROBACTER freundii</i>	00	01	01	02	0,07%
<i>MORGANELLA morgani</i>	00	01	01	02	0,07%
<i>SALMONELLA paratyphi</i> A	00	01	00	01	0,04%
<i>ENTEROBACTER cloacae</i>	00	00	01	01	0,04%
<i>ENTEROBACTER sakasaki</i>	00	00	01	01	0,04%
Contaminants :					
Staphylococcus non aureus (SNA)	235	248	252	735	26,18%
Bacilles Gram Positif (BGP)	28	34	36	98	3,49%
Levures	01	02	04	07	0,25%
Autres	00	00	00	00	0,00%
<b>TOTAL</b>	<b>788</b>	<b>981</b>	<b>1038</b>	<b>2807</b>	<b>100%</b>



.....  
**TABLEAU V : Principaux germes isolés des autres liquides biologiques**

DESIGNATIONS	ANNEES			Total	%
	2002	2003	2004		
<b>Résultats négatifs</b>	11	15	21	<b>47</b>	30,92%
<b>Nature des germes :</b>					
<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	15	12	12	<b>39</b>	25,66%
<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	02	09	04	<b>15</b>	9,87%
<i>HAEMOPHILUS influenzae</i> type b	01	02	03	<b>06</b>	3,95%
<b><i>ESCHERICHIA coli</i></b>	<b>00</b>	<b>03</b>	<b>03</b>	<b>06</b>	<b>3,95%</b>
<i>PROTEUS mirabilis</i>	01	02	01	<b>04</b>	2,63%
<i>SALMONELLA spp</i>	03	01	00	<b>04</b>	2,63%
<i>KLEBSIELLA pneumoniae</i>	01	01	00	<b>02</b>	1,32%
<i>SERRATIA fonticola</i>	01	00	01	<b>02</b>	1,32%
<i>ENTEROCOCCUS spp</i>	00	01	00	<b>01</b>	0,66%
<i>CITROBACTER freundii</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>ACINETOBACTER calcovar</i>	00	00	01	<b>01</b>	0,66%
<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe A	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>KLEBSIELLA oxytoca</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	00	00	01	<b>01</b>	0,66%
<i>PSEUDOMONAS spp</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>SERRATIA odorifera</i>	00	00	01	<b>01</b>	0,66%
<i>ENTEROBACTER cloacae</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>CITROBACTER youngae</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<i>ENTEROBACTER aerogenes</i>	01	00	00	<b>01</b>	0,66%
<b>Contaminants :</b>					
Staphylococcus non aureus (SNA)	03	08	03	<b>14</b>	9,21%
Bacilles Gram Positif (BGP)	02	00	00	<b>02</b>	1,32%
Levures	00	00	00	<b>00</b>	0,00%
Autres	00	00	00	<b>00</b>	0,00%
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>51</b>	<b>152</b>	<b>100%</b>



.....  
**3.3.1. *Escherichia coli* des prélèvements**

**TABLEAU VI :** Fréquence d'isolement d'*Escherichia coli* dans les prélèvements selon les années de la période d'étude.

Prélèvement Période	HEMOCULTURES	LCR	AUTRES LIQUIDES
2002	17	2	0
2003	8	1	3
2004	17	3	2

**3.3.2. Profil antibiotique des souches d'*Escherichia coli*****TABLEAU VII** : Profil antibiotique des souches d'*Escherichia coli* isolées pendant l'année 2002

GERMES	Nbre	Pourcentage de sensibilité des antibiotiques testés											
		AM -10		CRO-30		C-30		CIP-5		SXT		GM-10	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
<b>E. coli</b>	<b>19</b>	<b>5</b>	<b>26,31</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>36,84</b>	<b>17</b>	<b>89,47</b>	<b>3</b>	<b>15,78</b>	<b>6</b>	<b>31,57</b>

**TABLEAU VIII** : Profil antibiotique des souches d'*Escherichia coli* isolées pendant l'année 2003

GERMES	Nbre	Pourcentage de sensibilité des antibiotiques testés											
		AM -10		CRO-30		C-30		CIP-5		SXT		GM-10	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
<b>E. coli</b>	<b>12</b>	<b>4</b>	<b>33,33</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>6</b>	<b>50</b>	<b>12</b>	<b>100</b>	<b>2</b>	<b>16,66</b>	<b>7</b>	<b>58,33</b>



**TABLEAU IX** : Profil antibiotique des souches d'*Escherichia coli* isolées pendant l'année 2004

GERMES	Nbre	Pourcentage de sensibilité des antibiotiques testés											
		AM -10		CRO-30		C-30		CIP-5		SXT		GM-10	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
<b>E. coli</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>18,18</b>	<b>15</b>	<b>68,18</b>	<b>7</b>	<b>31,81</b>	<b>14</b>	<b>63,63</b>	<b>3</b>	<b>13,63</b>	<b>2</b>	<b>9,09</b>



# COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

## **4. COMMENTAIRES ET DISCUSSION**

### **Du point de vue de la méthodologie**

L'étude rétrospective de diagnostic de laboratoire des infections bactériennes invasives en cours concerne les prélèvements apportés de la pédiatrie sur lesquels des examens bactériologiques sont faits.

Ces prélèvements sont le sang, le liquide céphalo- rachidien et les autres liquides biologiques prélevés chez des enfants souffrant de suspicion d'infections bactériennes invasives (SIBI) comme les méningites, les pneumonies, les septicémies, les otites, les épiglottites et autres.

Les sangs sont prélevés dans des bouillons nutritifs mis en incubation dans l'appareil Bactec 9050 BD conçu pour la détermination rapide des bactéries, des champignons et d'autres microorganismes présents dans les hémocultures. La surveillance de ces hémocultures est programmée volontairement sur une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques vont de 7 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 les voyants lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore... tout ce qui concourt à diminuer le risque d'erreur humaine <sup>[3]</sup>. Un examen préliminaire est fait sur le liquide céphalo- rachidien, les hémocultures positives 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) aident aux résultats préliminaires. Il n'a pas été pratiqué d'examens chimiques du LCR (glycorachie, protéinorachie, chlorurorachie).

Les résultats préliminaires et définitifs sont saisis dans un logiciel GDH (pour Global Digital Health) en plus de la saisie dans les registres 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 électronique des données via le système Internet entre l'hôpital, le centre serveur au siège de CVD au CNAM et le Centre pour le Développement des Vaccins à l'Université de Baltimore (Maryland- USA).

### **Du point de vue des résultats**

Etant donné que certains sérotypes d'*Escherichia coli* (K1 en particulier) sont capables d'induire des infections néo-natales gravissimes, il nous a paru important de rechercher les *Escherichia coli* dans les suspicions d'infections bactériennes invasives chez les enfants de notre service de pédiatrie. Dans notre étude qui concerne la période de 2002 à 2004 nous avons étudié 5494 prélèvements d'hémocultures soit une moyenne annuelle de 1831. SAMAKE M. en 2003 a travaillé sur 2198 prélèvements de sang. Dans le même temps de 2002 à 2004, 2807 examens cyto bactériologiques du LCR ont été effectués soit une moyenne annuelle de 935 LCR contre 945 retrouvés chez SAMAKE T. en 2003. De l'ensemble de ces prélèvements il a été isolés 53 souches d'*Escherichia coli*. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b se trouvent comme chef de file des germes responsables de méningite.

Après *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* type b, les *Salmonella*, et *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* représente la 5<sup>eme</sup> bactérie mise en cause dans les hémocultures positives.

Au total 1512 hémocultures en bouillon Bactec sont sorties positives soit 27,52 % et 3982 négatives soit 72,48 %. Ce taux de positivité est légèrement supérieur à celui des méthodes d'hémocultures classiques (20 % de positif en moyenne).

Parmi ces hémocultures positives, 476 le sont par des contaminants soit 8,66 % et moins de 1 % (0,66 %) donne *in fine* une culture négative sur les milieux solides habituels.

La fréquence des infections à *Escherichia coli* a été de 0,96 % comparable à celle retrouvée en Cote d'Ivoire en 2000 par Dadié. A et coll soit 0,8 % [7].

SOUDE S. G. A. A. sur 156 hémocultures du service de pédiatrie de Cotonou au Bénin en 2004, trouve une fréquence de 0,98 %.[27]

En France chez les enfants de moins de 15 ans l'incidence trouvée est de 0,7 cas pour 100000 [28]

En plus des hémocultures effectuées, il a été demandé 2807 LCR et 152 autres prélèvements de liquides biologiques pour compléter le diagnostic.

L'examen cyto bactériologique du LCR a abouti à 575 résultats positifs soit un taux de 20,48 % avec des germes pathogènes.

Les *Escherichia coli* impliqués dans les suspicions d'infections bactériennes invasives (SIBI) sont retrouvés plus fréquemment dans les hémocultures que dans les autres types de prélèvements.

La sensibilité des antibiotiques sur *Escherichia coli* a été déterminée à partir de l'abaque du comité de la société française de Microbiologie édition de Janvier 2004.

Les souches d'*Escherichia coli* isolées de 2002 à 2004 restent sensibles à la ceftriaxone et la ciprofloxacine.

On observe une nette diminution de cette sensibilité à l'ampicilline à la gentamicine et au cotrimoxazole. Nous trouvons une plus grande résistance des souches d' *Escherichia coli* à la gentamicine au niveau de notre service de pédiatrie. *Escherichia coli* reste toutefois sensible à 95 % à la gentamicine chez les adultes dans l'étude de SEYDI M., SOUMARE M. et coll. au CHN de Fann de Dakar au Sénégal en 2003. [26].

La sensibilité au chloramphénicol reste relativement faible soit 39,55 %



**CONCLUSION**

## 5. CONCLUSION

Au terme de cette étude nous, avons pu évaluer la fréquence d'isolement des principaux germes impliqués dans les suspicions d'infection bactérienne invasive chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'HGT. Au nombre de ces germes, *Escherichia coli* occupe une place prépondérante quand on connaît l'importance majeure des souches de type K1 et le rôle plus général de principales bactéries des infections nosocomiales dans tous les hôpitaux du monde. La méthodologie moderne des hémocultures avec le Bactec 9050 a permis une approche bactériologique aisée. Sur une période de 3 ans de 2002 à 2004, 5494 hémocultures effectuées ont permis l'identification de 53 souches d'*Escherichia coli*. Les examens cyto-bactériologiques du Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) et les autres prélèvements biologiques pour étayer le diagnostic donnent peu soit 11 souches non présentes dans les hémocultures. Les d' *Escherichia coli* restent sensibles aux céphalosporines de 3eme génération et aux fluoroquinolones. La résistance est des plus marquée aux betalactamines (ampicilline) et dans une certaine mesure aux aminosides

## REFERENCES

### 1. Bactéries pathogènes pour l'homme

<http://www.123bio.net/cours/bacterie/école.html>

### 2 Becton, Dickinson and Company. BACTEC 9050 Manuel d'utilisation.

Numéro du document MA-0103. Révision : E Réf 445845. Septembre 2004.

### 3 Berche P, Gaillard JL, Simonet M. Bactériologie : Bactéries des infections humaines. Flammarion, 1988, P100-06-07, 324, 537-38, 544-45.

### 4. Berche P, Les bactéries des diarrhées aiguës

[www.educ.necker.fr/cours/module7/bacteries\\_dirrhee.pdf](http://www.educ.necker.fr/cours/module7/bacteries_dirrhee.pdf)

### 5. BioMérieux B. V. Bactériologie Mars 2003. Réf. 247003.

### 6. Bopp C A, Brenner F W, Field P I, Wells J G, et Strogbine N A. *Escherichia, Shigella, and, Salmonella*. In Patrick R M, Ellen J James and al. Manual of clinical Microbiology. 8<sup>TH</sup> Edition, 2003,42 : P 654.

### 7. Dadié T, karou N, Adoun A, Ketté, Dosso M. Isolement d'agents pathogènes entériques en Côte d'Ivoire : *Escherichia coli* O157 : H7 et E coli enteroagrégant. Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, courte note n° 2130. 'Bactériologie' mars 2000

[www.pathexo.fr/pages/2000n2.html](http://www.pathexo.fr/pages/2000n2.html)

### 8. ENTEROBACTERIES : *Escherichia coli* ; P 4, 5, 6, 7

[Anne.decoster.fr/bgn/enterob.htm](http://Anne.decoster.fr/bgn/enterob.htm)

### 9. *Escherichia coli*

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://fr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)

**10. Ferron A.** Bactériologie médicale. La Madelaine : Crouan et Roque, 1984 ,126-28

**11. Flandrois J P.** Bactériologie médicale. Lyon 1997, P174.

**12. GASTRO- ENTERITES dues à *Escherichia coli***

[www.liste-hygiene.org/ESCHE.html](http://www.liste-hygiene.org/ESCHE.html)

**13. Guibert J, Goldstein F W, Lafaix C et Gaudin H.** Infections à entérobactéries Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses. 1981.

**14. Jaeger F, Leroy J, Estavoyer JM, et Hoen B.** Infections à *HAEMOPHILUS*. Encycl Méd Chir Maladies infectieuses, 1999.

**15. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A.** De l'antibiogramme à la prescription, biomérieux

**16. Leclerc H, Mossel DAA.** Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments, Paris ; Doin 1989

**17. Le Minor L, Richard C. INSTITUT PASTEUR.** Méthode de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries

**18. Le Minor L, Sansonetti PH, Richard CL, Grimmont F, Mollaret H, Bercovier H, et Alonso JM.** Entérobactéries In Le Minor L, Veron M, eds Bactériologie médicale. Paris : Flammarion, 1989, P396.

**19. MICROBIOLOGIE.** Les milieux de culture en boites  
[www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html#boites](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/milieux.html#boites)

- 20. Murray P R, Hollick G E, Jerris R C, Wilson. M L.** Journal of clinical Microbiology, June 1998, p.1601–1603f
- 21. Pechere J C, Murray G, Côté L, et Temblay C L.** Bases bactériologiques de la thérapeutique antibactérienne. In **Le Minor L, Veron M**, eds Bactériologie médicale. Paris : Flammarion, 1982, P.228-25-29-46-48-49
- 22. Procédures et Techniques de Laboratoire d'Analyses** (protocoles approuvés) CVD- Mali
- 23. Riegel P.** Infections urinaires nosocomiales de l'adulte.2003, Volume : 33 numero : 4, P 256s. Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales
- 24. Samaké M.** Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm, Bamako, 2003
- 25. Samaké T.** Pratique de l'examen cyto-bactériologique du liquide céphalorachidien au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré, Aspects méthodologiques. Thèse Pharm, Bamako, 2003
- 26. Sawadogo M.** Bactériologie des méningites purulentes au CHU de Dakar Thèse Méd, Dakar, 1985
- 27. Seydi M, Soumaré M, Sow A I, Diop B M, Sow P S.** Méningites au cours des bactériémies à *Escherichia coli* à la clinique des maladies infectieuses Ibrahima- Diop- Mar du Centre Hospitalier National de Fann à Dakar (Sénégal). Médecine et Maladies Infectieuses, 2005, 35, 346

- 28. Soude S G A A.** Bactéries isolées des hémocultures au centre national hospitalier et universitaire Hubert Koutoukou Moga de Kotonou- Bénin  
Thèse Pharm, Bamako, 2005
- 29. Sow S O, Diallo S, Campbell J D, Tapia M D, Keita T, Keita M M,** et al.  
Burden of invasive disease caused by Haemophilus influenzae type b in Bamako, Mali : impetus for routine infant immunization with conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 2005 Jun; 24 (6) : 533-7
- 30.** Surveillance du syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans en France en 1998. *Euro surveillance Monthly archives* 2000, 5, 68
- 31. [www.chez.com/guatemalt/ESCHE.html](http://www.chez.com/guatemalt/ESCHE.html), 09/04/2005**

# **RESUME**

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom** DEMBELE

**Prénom** Makandian

**Titre de la thèse** Fréquence d'isolement des souches d'*Escherichia coli* au laboratoire de l'hôpital Gabriel Touré de février 2002 à décembre 2004.

**Année Universitaire** 2005 2006

**Ville de soutenance** Bamako

**Pays d'origine** Mali

**Lieu de dépôt** Bibliothèque de la Faculté de médecine, de Pharmacie, et d'Odontostomatologie

**Secteurs d'intérêt** Bactériologie, Santé publique, Pédiatrie

### RESUME

Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur l'examen bactériologique des prélèvements effectués chez des enfants de moins de 17 ans hospitalisés dans le service de *Escherichia coli* de l'hôpital Gabriel Touré. Cette étude s'étend sur la période de février 2002 à décembre 2004.

Elle vise à déterminer la fréquence des *Escherichia coli* parmi les germes isolés des examens bactériologiques.

Nous avons obtenu les résultats suivants

- Nombre total de prélèvement (hémocultures, LCR, Autres liquides biologiques) 8453
- Nombre total des hémocultures 5494 soit 64,99 % des prélèvements.
- Nombre total de LCR 2807 soit 33,21 % des prélèvements
- Nombre total des autres liquide biologique 152 soit 1,79 % des prélèvements

De l'ensemble des prélèvements effectués on a trouvé 53 souches d'*Escherichia coli* soit une fréquence de 0,96 % répartis entre 52,8 % de garçon et 47,2 % de fille avec un ratio de 1,12 en faveur des garçons

*Escherichia coli* a montre une résistance a l'ampicilline 74,0 6%, a la gentamicine 67,0 % a la cotrimoxazole 84,64 % et au chloramphenicol 60,45 % mais une sensibilité de 89,39 % et 84,36 % respectivement a la ceftriaxone et a la ciprofloxacine.

**MOTS CLES** *Escherichia coli*, Pédiatrie, Prélèvements.

### SUMMARY

It is about a retrospective study relating to the bacteriological examination of the taking away carry out in children of less than 17 years hospitalize in the service of *Escherichia coli* of the hospital Gabriel Touré. This study extends over the period from February 2002 has December 2004.

It aims has to determine the frequency of *Escherichia coli* among the germs isolated from the bacteriological examinations.

We obtained the following results

- Total taking away numbers (hémocultures, LCR, Others liquidate biological) 8453
- Numbers total hémocultures 5494 is 64,99 % of the taking away.
- Total LCR 2807 numbers is 33,21 % of the taking away
- Numbers total others liquidates biological 152 is 1,79 % of the taking away

Of the whole of the taking away carry out one A finds 53 stocks of *Escherichia coli* S ILO a frequency of 0,96 % left again between 52,8 % of boy and 47,2 % of girl with a ratio of 1,12 in favour of the boys

*Escherichia coli* has watch a resistance has ampicilline 74,0 6%, has gentamicin 67,0 % has the cotrimoxazole 84,64 % and to chloramphenicol 60,45 % but a sensitivity of 89,39 % and 84,36 % respectively has the ceftriaxone and has the ciprofloxacine.

**MOT. CLES** *Escherichia coli*, Pediatrics, Taking away.

# ANNEXES