

première
Partie :
Généralités

CHAPITRE I : LE DIAGNOSTIC EN BACTERIOLOGIE

1. GENERALITES DU DIAGNOSTIC [33]

La meilleure façon d'affirmer la nature infectieuse d'une maladie est d'isoler de l'organisme le germe en cause. C'est là le diagnostic direct qui n'est malheureusement pas toujours réalisable.

Dans le laboratoire de microbiologie, il n'existe pas une méthode générale d'examen qui puisse permettre l'isolement de tous les microorganismes pathogènes susceptibles d'être présents dans un prélèvement donné. Le clinicien doit donc orienter les recherches en communiquant des renseignements cliniques concernant son malade. Quelques fois, les premiers résultats de l'examen microbiologique peuvent conduire le médecin à reconsiderer son diagnostic clinique et à modifier la thérapeutique qu'il a entreprise.

Le bactériologiste doit faire la différence entre, d'une part, le germe responsable, d'autre part, les germes commensaux normalement présents sur les manifestations infectieuses.

Dans certains cas l'agent infectieux peut avoir disparu avant ou après l'apparition des symptômes, à la suite d'un traitement antibiotique antérieur. Dans d'autres cas, les techniques d'isolement sont longues et délicates et d'application difficile dans un laboratoire non spécialisé. Le diagnostic indirect, alors seul possible, cherche à mettre en évidence chez le sujet suspect divers anticorps caractéristiques de l'affection (sérodiagnostic). Ils n'apparaissent pas immédiatement mais après une certaine durée d'évolution de la maladie et persistent souvent longtemps après la guérison. La recherche d'une hypersensibilité de type retardé dont le mécanisme d'installation est identique, rentre aussi dans la cadre du diagnostic indirect.

La nécessité de la liaison laboratoire-clinique est essentielle. Si cette coopération n'existe pas, les malentendus se produiront au détriment du malade.

2. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE OU DIRECT [33]

2.1. Prélèvement à effectuer en cas d'infection microbienne

Il est indispensable que tout envoi soit accompagné d'une fiche donnant les indications sur la nature du produit pathologique, le nom, le prénom, l'âge du sujet, les conditions de prélèvement. Il faudra en cas de prélèvements multiples (hémocultures) indiquer le jour et l'heure de leur réalisation. Au cas où le malade aurait reçu des antibiotiques avant le prélèvement, il sera nécessaire de le mentionner. Il va de soi que, chaque fois que c'est possible, les prélèvements seront effectués avant toute administration d'antibiotiques.

Les méthodes de prélèvement varient selon le siège de l'infection et selon le germe que l'on compte découvrir. En général, un prélèvement précoce augmente les chances de découvrir le micro-organisme responsable.

Toute contamination du produit prélevé peut être cause d'erreur dans l'interprétation des résultats. Aussi faut-il chercher à l'éviter en respectant les règles d'asepsie élémentaires.

Le transport des prélèvements doit être fait selon des règles précises. Certains germes ne peuvent survivre à l'exposition, même courte, à une température inférieure à celle de l'hôte. D'autres supportent très mal la dessication ou le contact avec l'oxygène.

La conséquence en est la nécessité d'un ensemencement très rapide, l'utilisation d'un milieu de transport ou le prélèvement dans un flacon à fermeture hermétique rempli d'un mélange gazeux inerte (anaérobies). La plupart des germe, au contraire, se multiplient activement et risquent, en cas d'association dans un produit pathologique, de rendre difficile l'isolement du germe recherché. Dans ce cas, il faut conserver les prélèvements à basse température.

2.2.1. Examen macroscopique

Il permet de noter une modification de l'aspect, de l'odeur, orientant déjà le diagnostic.

2.2.2. Examen microscopique

Il peut se faire à l'état frais, après coloration ou même par immunofluorescence.

a. **Examen à l'état frais :** Une goutte du produit pathologique placée entre la lamelle et la lamelle est examinée au microscope à l'objectif 40. Cet examen rapide permet de définir le nombre, la morphologie et surtout la mobilité des germes présents. Il permet également d'apprécier la composition de l'exsudat inflammatoire. Le microscope à fond noir est employé pour la détection du tréponème dans la sérosité d'un chancre ou d'un ganglion.

b. **Examen après coloration :** Un étalement du produit pathologique ou de son sédiment centrifugé est soumis à la coloration de Gram. Pour certains germes des colorations spéciales sont indispensables, telle la coloration de Ziehl-Neelsen pour la mise en évidence des mycobactéries.

Il est évident que l'examen microscopique ne permet que rarement l'identification précise d'un germe. En revanche, il renseigne sur la présence de bactéries dans un produit pathologique. De ce fait, il peut être utile pour le clinicien. Parfois il constitue le seul moyen de diagnostic bactériologique, par exemple pour la lèpre, dont l'agent causal est incultivable.

c. **Examen par immunofluorescence :** Cette méthode permet d'emblée l'identification de certaines bactéries et permet de déterminer le sérotype au sein d'une espèce bactérienne. Elle consiste à faire agir sur un étalement du produit pathologique un antisérum spécifique, marqué par incorporation d'une substance fluorescente (isothiocyanate de fluorescéine). Examiné en lumière ultraviolette, le germe, revêtu de l'anticorps spécifique, peut être facilement repéré par sa fluorescence.

2.2.3 Recherche d'antigènes solubles

Elle consiste à rechercher immunologiquement des antigènes bactériens libérés au cours de l'infection dans divers liquides organiques.

2.2.4. Mise en culture du produit pathologique

L'examen microscopique ne constitue généralement qu'une étape d'orientation, seule la culture permettra l'identification complète des bactéries.

a. Isolement des bactéries : Le produit pathologique estensemencé dans des milieux favorables simples ou enrichis, en aéro anaérobiose, éventuellement sélectifs, lorsqu'on soupçonne un germe particulier. On utilise principalement des milieux solides qui permettent d'isoler les bactéries et de reconnaître l'existence éventuelle d'une flore microbienne mixte.

Le plus souvent, l'isolement est obtenu en étalant l'inoculum au moyen d'une anse de platine, en stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu solide. Après une ou deux nuits d'étuve, les germes ainsi séparés les uns les autres donneront naissance chacun à une colonie bactérienne, constituant un clone homogène. En repiquant une colonie dans un milieu neuf on obtiendra une culture pure.

Il est fréquemment fait appel à des milieux sélectifs. Bien souvent les renseignements cliniques ou l'examen direct du produit pathologique permettent d'orienter l'examen d'emblée vers la recherche précise de tel ou tel germe. On peut alors utiliser des milieux enrichis de substances diverses connues pour favoriser la croissance d'un germe, ou pour inhiber les bactéries non recherchées.

b. Identification des bactéries : Cette identification doit obligatoirement être faite à partir d'une culture pure. Rappelons-en brièvement les différentes étapes:

- ◆ Caractères morphologiques du germe: forme, groupement, mobilité, type de ciliature, spore, capsule, coloration de Gram...

- ◆ Caractères de culture : rapport avec l'oxygène, exigences nutritives aspect des colonies, pigmentation, hémolyse sur gélose au sang, odeur particulière.
- ◆ Propriétés biochimiques qui consistent à définir l'équipement enzymatique de la bactérie; métabolisme glucidique, lipidique, protéique.
- ◆ Si pour certaines bactéries l'identification s'arrête à ce stade, pour d'autres il est important de préciser les constituants antigéniques au moyen de sérum spécifiques agglutinants ou précipitants.
- ◆ Eventuellement le pouvoir pathogène expérimental sera recherché par inoculation à l'animal, mettant alors en évidence la virulence de la souche (bacille de la tuberculose) ou ses caractères toxigènes (bacille diphtérique).
- ◆ Dans un contexte épidémiologique particulier, il peut être utile de pousser l'identification de la souche jusqu'au stade du lysotype

2.2.5. Inoculation à l'animal

Dans certains cas précis, l'inoculation directe du produit pathologique à l'animal réceptif peut être envisagée. Les bactéries, même peu nombreuses, trouvent alors dans cet hôte des conditions plus favorables à leur multiplication. Le développement d'une maladie typique permet du même coup de suspecter l'identification de la bactérie. A partir du sang ou des viscères de l'animal on peut isoler le germe en culture pure.

3. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE OU INDIRECT [33]

L'infection bactérienne entraîne la libération, dans l'organisme infecté, de nombreux antigènes : antigènes somatiques (antigène O), antigènes flagellaires (antigènes H), antigènes d'enveloppe (antigènes K), antigènes enzymatiques (hémolysines, protéases, lipases, DNases...), antigènes toxiques, etc. Ces antigènes induisent une réponse immunitaire spécifique. Celle-ci est double :

-réponse humorale: c'est l'apparition d'anticorps spécifique.

-réponse cellulaire: c'est l'apparition d'une hypersensibilité de type retardé.

3.1. Recherche des Anticorps Spécifiques = Sérodiagnostic

- ♦ Principe : Le réactif à utiliser est l'antigène bactérien (Ag) connu, plus ou moins complexe (corps bactériens ou antigène purifié). Cet antigène est mélangé avec le sérum à tester. Si ce sérum possède des anticorps (Ac), spécifiques de l'antigène, il se forme des immuns-complexes Ag-Ac, détectables. Le sérum est dit « positif ». Si ce sérum ne possède pas d'anticorps spécifiques de l'antigène, on ne peut détecter la présence d'immuns complexes. Le sérum est dit « négatif ».

Cette réaction **qualitative** devient **quantitative** en utilisant des dilutions sérielles de sérum : le titre de positivité est la plus faible dilution de sérum donnant encore une réaction positive.

- ♦ Modalités de mise en évidence in vitro des immuns-complexes: selon les cas, on utilise préférentiellement une des réactions suivantes:

a. Immuno-précipitation : Les immuns- complexes s'agglomèrent pour former un précipité insoluble visible. Cette réaction peu sensible, sert au titrage des anticorps antitoxiques (antitoxines).

b. Immuno-agglutination : L'antigène étant constitué de corps bactériens, les anticorps (agglutinines) agglutinent ces bactéries ; il se forme des amas visibles. Les principaux sérodiagnostics bactériens par agglutination sont la réaction de Widal- Félix (fièvres typhoïdes) et la réaction de Wright (brucellose).

Dans certains cas, les anticorps se fixent sur les déterminants antigéniques bactériens sans provoquer d'agglutination. La méthode de Coombs qui fait intervenir un sérum animal antiglobulines humaines permet de mettre en évidence ces anticorps bloquants.

c. Réaction d'agglutination passive : Une suspension d'hématies ou de particules inertes (microcristaux de cholestérol, particules de latex) est « sensibilisée » avec un antigène bactérien, c'est -à-dire que chaque hématie ou chaque particule se trouve recouverte d'antigène. Les anticorps antibactériens se

combinant avec l'antigène agglutinent les hématies ou les particules inertes. C'est ainsi, par exemple, que l'on détecte les anticorps syphilitiques. Lorsque la réaction utilise une suspension d'hématies, on parle d'hémagglutination passive.

d. Réaction de fixation du complément : Les immuns-complexes sont détectés grâce à leur propriété de fixer le complément sérique. C'est une réaction très générale qu'on utilise seulement dans ces cas précis.

e. Réactions de neutralisation : Quand l'antigène possède une activité (toxique ou autre) décelable *in vitro*, cette activité se trouve neutralisée par l'anticorps spécifique. Par exemple, la streptolysine O lyse les hématies ; cette lyse est empêchée par les anticorps antistreptolysine O (ASLO).

f. Réactions détectant les anticorps fixés aux bactéries à l'aide d'antisérum marqués anti-gammaglobulines humaines : Dans ces types de réactions, les bactéries (antigène) sont étalées sur une lame. On recouvre la lame avec le sérum à tester. Si ce sérum contient des anticorps, ceux-ci se fixent sur les bactéries. Après lavage, on met en évidence les anticorps fixés à l'aide d'antiglobulines marquées, soit par de la fluorescéine (immuno-fluorescence), soit par une enzyme (peroxydase).

g. Autres réactions : Il existe des sérodiagnostics propres à certaines maladies bactériennes ; c'est le cas de la réaction d'immobilisation des tréponèmes (Test de Nelson) dans la syphilis.

3.2. Recherche d'une Hypersensibilité Spécifique de type retardé

L'infection bactérienne détermine non seulement l'apparition d'une immunité à médiation humorale (anticorps), Mais aussi une immunité à médiation cellulaire (présence de cellules lymphoïdes sensibilisées).

Mise en évidence de l'immunité à médiation cellulaire :

Il existe des tests immunologiques in vitro de mise en évidence de cette immunité (transformation lymphoblastique, inhibition de la migration des macrophages). Ces réactions ne sont pas utilisées en diagnostic immunologique des infections bactériennes.

La réaction la plus commune reste le test d'hypersensibilité retardée dont le type est la tuberculino-réaction.

Elle consiste à introduire dans la peau (voie épidermique ou intradermique) l'antigène bactérien, dit allergène, et de noter, 2 à 4 jours après, l'apparition d'une réaction cellulaire locale sous forme de papule érythémateuse. Une réaction positive signe une hypersensibilité spécifique.

Des tests cutanés d'hypersensibilité sont utilisés dans les maladies bactériennes suivantes : tuberculose, lèpre, brucellose, tularémie.

Interprétation des tests d'hypersensibilité cutanée

Les résultats de ces épreuves cutanées doivent être soumis à l'analyse critique clinique. D'une part, les fausses positivités ou les fausses négativités ne sont pas rares. D'autre part, une réaction positive ne signe pas obligatoirement l'existence actuelle de l'infection car l'hypersensibilité cutanée persiste pendant très longtemps. C'est ainsi qu'une tuberculino-réaction positive indique seulement qu'à un moment donné, souvent lointain, le sujet a été tuberculisé.

Tous ces tests n'ont de valeur que si on arrive à saisir le « le virage » de la cuti-réaction.

Rappelons enfin que ces tests ne sont pas pratiqués au laboratoire, mais en service clinique.

CHAPITRE II : RESISTANCE BACTERIENNE

1. HISTORIQUE

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue peu de temps après l'introduction de la pénicilline G en thérapeutique [32, 32].

En effet la pénicilline G n'était plus active que sur quelques souches de staphylocoques.

En 1953, au Japon, furent isolées des shigelles multi-résistantes notamment au chloramphénicol, à la tétracycline, à la streptomycine et aux sulfamides [38].

2. NOTION DE RESISTANCE-ELEMENTS DE DEFINITION

L'une des principales caractéristiques d'un antibiotique est son spectre d'activité. Il regroupe toutes les espèces bactériennes pouvant être détruites ou inhibées par une concentration de cet antibiotique inférieure à la concentration la plus élevée qu'un individu normal pouvait supporter, et qui arrive au site d'action.

Suivant que le nombre de souches concernées est élevé ou non et suivant qu'il s'agisse de bactéries à Gram positif ou à Gram négatif on parlera de spectre d'activité étroit ou de spectre d'activité large.

La résistance bactérienne se traduit sur le plan clinique par l'échec thérapeutique. In vitro celle-ci se traduit par l'augmentation significative de la CMI concentration minimale inhibitrice habituelle. Une bactérie est dite résistante lorsqu'elle est apte à se multiplier dans un milieu où la concentration en antibiotique est nettement plus élevée que celle qui empêche habituellement le développement des souches de la même espèce.

In vivo : Une bactérie est dite résistante à un antibiotique lorsqu'elle peut supporter des concentrations efficaces de cette drogue pouvant atteindre le site de l'infection.

Ces, différentes définitions peuvent être précisées avec le type de résistance ainsi qu'avec les mécanismes mis en jeu.

3. TYPES DE RESISTANCE [3, 17, 31, 37, 44, 48]

3.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle concerne l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne (48). Elle est à médiation chromosomique, elle est prédictible (23). On peut citer l'exemple de la résistance naturelle des streptocoques et entérocoques aux aminosides et celle de toutes les bactéries à Gram négatif aux glycopeptides.

3.2. Résistance acquise

La résistance acquise ne s'applique qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne. Elle est due à une modification génétique: mutation ou apport de matériel génétique étranger (plasmides, transposons) [2, 49]. La résistance par mutation et la résistance dite secondaire sont similaires mais cliniquement il existe une énorme différence.

La résistance acquise par mutation chromosomique est préexistante alors que celle secondaire peut découler de l'utilisation thérapeutique de l'antibiotique (27).

La résistance secondaire est due à la pression de sélection qui découle de l'utilisation abusive de certains antibiotiques.

3.3. Résistance clinique [24, 47]

Elle se traduit par l'échec thérapeutique ; plusieurs facteurs entre en cause dans ce type de résistance :

- facteurs environnementaux (cations, protéines inhibitrices, etc.)
- la pharmacinétique
- choix judicieux de l'antibiotique

3.4. Résistance transférable

L'antibiorésistance est transférable ; elle est médiée par les plasmides qui sont des ADN extra-chromosomiques qui contiennent le code génétique de la résistance et

qui sont transférés d'une bactérie à une autre. Le transfert de plasmides peut se faire par conjugaison ou par l'intermédiaire de bactériophage ou de transposons.

3.4.1. Conjugaison

La conjugaison est le plus important des mécanismes de transfert de résistance spécifiquement chez les bactéries à Gram négatif (36). Elle nécessite un contact étroit entre la bactérie donatrice et celle réceptrice ; ce transfert est sous la dépendance d'un facteur de résistance qui est un plasmide (RF Plasmide) (36).

3.4.2. Transfert par bactériophages

C'est le phénomène de transduction ; elle est retrouvée aussi bien chez les bactéries à Gram négatif qu'à Gram positif. La transduction est médiée par des bactériophages qui sont des virions capables de passer d'une bactérie à une autre et susceptibles d'insérer dans le génome bactérien un gène de résistance.

La transduction peut être localisée ou généralisée ; lorsqu'elle est généralisée, elle est complète ou abortive.

3.4.3. Transfert de transposons

Les transposons sont de minuscules pièces d'ADN qui peuvent provenir des plasmides (36) ou du génome bactérien et qui représentent une forme permanente de médiation de résistance.

3.5. Résistance inductible [36]

Dans ce type de résistance, la bactérie est originairement sensible à l'antibiotique. Cependant à cause des effets ravageurs de la drogue, les bactéries n'arrivent plus à absorber et deviennent aussi réfractaires à toute absorption supplémentaire. Ce concept relativement nouveau dans l'action des antibiotiques vis à vis des bactéries concerne notamment les aminoglycosides (Streptomycine, Gentamicine) dans lesquels les systèmes de transport énergie dépendants sont responsables des mouvements de la drogue vers le cytoplasme des bactéries.

4. SUPPORT GENETIQUE [3, 17, 31, 44, 48]

Au plan génétique, la résistance acquise peut survenir par mutation ponctuelle, par remaniement du génome ou par acquisition de matériel génétique étranger. Il existe deux supports essentiels.

4.1. Résistance chromosomique

4.1.1. Résistance chromosomique par mutation

Il peut s'agir d'une mutation ponctuelle dans un gène de résistance entraînant par exemple une hypersécrétion d'enzymes inactivant les antibiotiques ou dans un gène de structure qui modifie le spectre d'une enzyme.

Une mutation se caractérise par:

- La rareté
- La spontanéité
- La discontinuité
- La spécificité et l'indépendance
- La stabilité

4.1.2. Résistance chromosomique par remaniement

Il peut s'agir d'un remaniement du génome : à titre d'exemple l'insertion de séquence apportant un promoteur permettant d'exprimer des gènes silencieux ou alors l'acquisition de fragments de chromosomes étrangers par transformation.

4.2. Résistance extra-chromosomique

L'information génétique est apportée par des plasmides transférables à d'autres bactéries par conjugaison, par transduction ou par transformation (46). L'ensemble de ces gènes peut être sur des fragments d'ADN appelés transposons qui peuvent s'intégrer soit dans des plasmides soit dans le chromosome en allant de l'un à l'autre.

5. MECANISME DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

5.1. Résistance aux bêta-lactamines [22]

5.1.1. Résistance par production d'enzymes inactivant l'antibiotique

Le principal mécanisme qui intéresse les cocci est celui de la production de bêta-lactamase. Ainsi les bêta-lactamases sont des enzymes qui hydrolysent le noyau bêta-lactame des Bêta-lactamines ; la réaction précise de l'enzyme avec le composé varie mais la réaction générale est la formation d'un intermédiaire enzymatique acylé. L'interaction des Bêta-lactamines avec les bêta-lactamases entraîne un fonctionnement convenable des acides aminés au site actif de l'enzyme, ce qui entraîne une acylation suivie d'une désacylation. La bêta-lactamase initiale est inactivée alors que celle qui vient d'être libérée est capable d'attaquer une autre molécule de Bêta-lactamine. Les Bêta-lactamases sont d'origine plasmidique chez les cocci. Leur mode de synthèse est dans ce cas inductible ; chez ces cocci les bêta-lactamases sont excrétées dans le milieu (exo-enzymes). Nous avons aussi l'exemple de la résistance des staphylocoques à la pénicilline, à l'ampicilline, à la ticarcilline et à la pipéracilline. Cette résistance à la pénicilline se manifeste par production d'une pénicillinase souvent plasmidique et inductible qui ne touche pas les pénicillines semi-synthétiques comme l'oxacilline.

5.1.2. Absence ou modification de la protéine cible

Ce mécanisme de résistance peut se rencontrer chez les micro-organismes présentant des anomalies de la paroi (Streptocoques déficients). La transpeptidase de ces germes est modifiée et perd une grande partie de son affinité pour la pénicilline. Chez les cocci, c'est la modification des PLP (protéines liant la pénicilline) qui représente le mécanisme principal de la résistance non enzymatique.

Ainsi une diminution de l'affinité des PLP «essentiels » pour les Bêta-lactamines par mutation, requiert plus de Bêta-lactamines pour saturer les sites et va donc entraîner une augmentation de CMI jusqu'à plusieurs centaines de fois la CMI initiale.

Plusieurs Types de modifications peuvent être rencontrés : (voir tableau I)

➤ **Modification de l'affinité de la PLP essentielle pour les Bêta-lactamines**

Dans ce cas, elle est diminuée pour toutes les Bêta-lactamines mais de manière inégale selon les molécules.

➤ **L'augmentation de la quantité de PLP**

Ce mécanisme a été bien élucidé chez *Enterococcus faecium*. On a démontré que la PLP 5 présente en faible quantité dans les souches sensibles, augmente d'un facteur 10 à 20 dans les souches résistantes et peut s'accompagner d'une diminution d'affinité pour les Bêta-lactamines. Cette PLP prend la fonction de PLP essentielle par rapport aux autres.

➤ **Acquisition d'une nouvelle PLP qui va prendre le rôle de PLP essentielle**

C'est le cas de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline. La résistance aux Bêta-lactamines par modification des PLP est croisée pour toutes les Bêta-lactamines.

Tableau I : Résistance liée à des modifications de PLP chez les bactéries à Gram+

Types de résistance	Espèces
Diminution d'affinité pour les Bêta-lactamines	<i>Streptococcus pyogènes</i>
Augmentation de la quantité d'une PLP essentielle	Enterocoques
Acquisition d'une nouvelle PLP	<i>Straphylococcus aureus</i>
Multiples modifications de PLP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

5.1.3. Tolérance bactérienne

Une bactérie est dite tolérante lorsque, ayant conservé la même sensibilité (même CMI) vis à vis d'un antibiotique bactéricide, il existe une augmentation considérable de la CMB avec un rapport CMB/CMI supérieur à 32. L'effet bactériostatique persiste, mais l'effet bactéricide a disparu.

La mise en évidence de ce phénomène au laboratoire s'effectue par la détermination de la CMI et de la CMB de la souche à tester ou par mesure soit du nombre de bactéries survivantes, soit de la lyse bactérienne par la méthode opacimétrique en fonction du temps et en présence d'une concentration d'antibiotiques supérieure à la CMI.

Le mécanisme de la tolérance aux bêta-lactamines s'exprime lorsqu'il existe soit une suppression, soit une inhibition autolytique.

Le déficit en mureine hydrolase par mutation ou par persistance du dépresseur physiologique de la mureine hydrolase serait une des voies à l'origine de la tolérance.

Le phénomène de tolérance découvert avec le pneumocoque a été observé chez d'autres espèces bactériennes. En 1997, SABATH observe un tel phénomène chez *Staphylococcus aureus*, aussi bien à l'égard des bêta-lactamines que d'autres antibiotiques agissant au niveau de la paroi bactérienne comme la vancomycine.

5.2. Résistance aux aminosides [4, 7, 22, 24, 37]

5.2.1. Résistance acquise

➤ **Altération de la cible**

Le changement d'un seul acide aminé dans une protéine ribosomale entraîne une diminution de l'affinité du ribosome pour un antibiotique.

Ces mutants résistants ne constituent pas un problème thérapeutique : ils sont rares en clinique et impliquent pour la plupart des aminosides, des mutations multiples pour atteindre un haut niveau de résistance. Et enfin, de l'absence de chevauchement des sites de fixation de divers aminosides sur les ribosomes, ils ne présentent pas une résistance croisée envers les autres membres de la famille.

➤ **Interférence avec le transfert de l'antibiotique-**

La pénétration des aminosides dans les bactéries est un phénomène :

- de diffusion passive au travers des porines de la membrane externe.

- de transport actif requérant de l'énergie au niveau de la membrane interne.

Les CMI sont facilement augmentées et ce type de résistance est de détection délicate ; les mutations qui affectent le système actif de transport entraînent une diminution de l'accumulation d'antibiotiques dans la cellule.

➤ Détoxication enzymatique des antibiotiques

La modification enzymatique des aminosides médiée par les plasmides constitue le mécanisme de résistance à ces antibiotiques le plus fréquemment rencontré en clinique. Les enzymes sont divisées en trois classes :

Aminosides phosphotransferables (APH), aminosides nucléotidyl transférases (ANT) et aminosides acetyltransferases (ANC) en fonction de la réaction et du site de la molécule d'antibiotique qu'elles modifient.

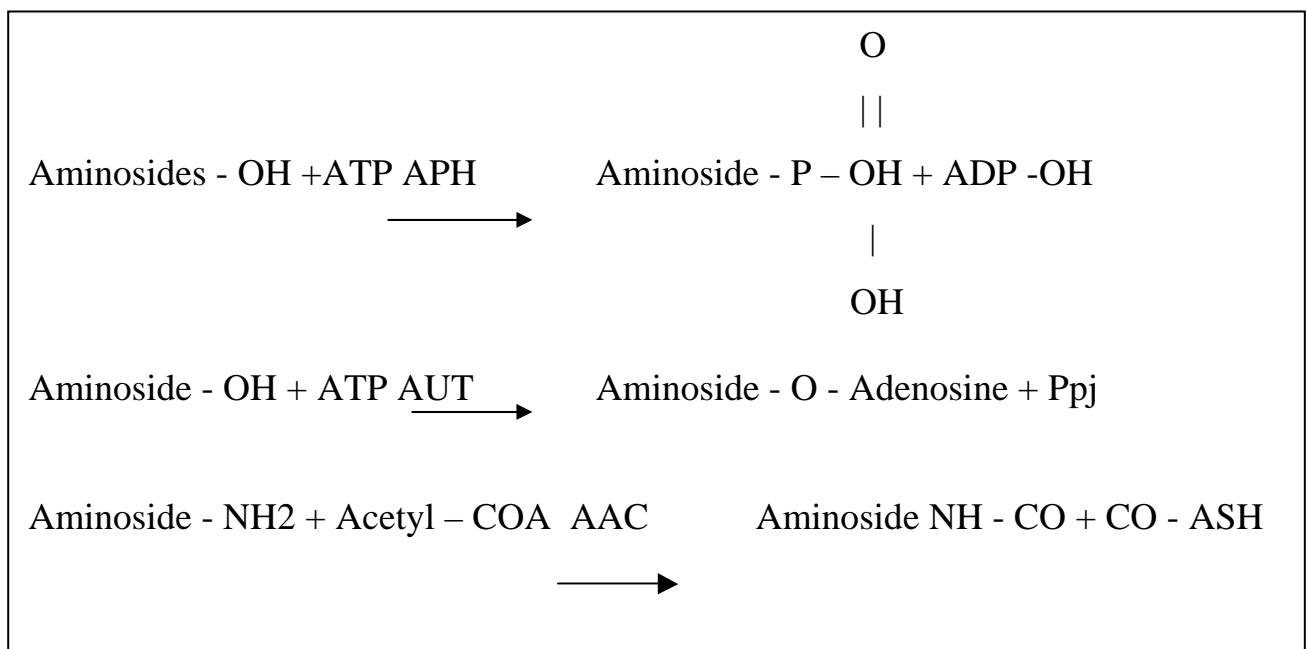


Figure 1 : Modification enzymatique des aminosides : phosphorylation ou adénylation d'un groupement hydroxyle, acétylation d'un groupement aminé.

Les enzymes différents dans leurs éventails de substrats et quelques-unes existent sous diverses formes isozymiques.

Le problème de la sélection *in vivo* et de la dissémination ultérieure des mécanismes de résistance est encore compliqué. En effet, la majorité des souches

résistantes aux aminosides hébergent un ou plusieurs plasmides codant chacun fréquemment pour plusieurs enzymes modificatrices ou associent divers mécanismes de résistance.

Seules les phosphotransférases confèrent un très haut niveau de résistance.

L'enzyme confère à l'hôte la capacité de croître en présence de plus fortes concentrations d'antibiotiques non modifiés.

La résistance est due à l'équilibre entre un transport peu efficace des aminosides à l'intérieur de la bactérie et l'inactivation enzymatique de ces molécules. Le phénotype résistant conféré par une enzyme donnée dépend à la fois quantitativement et qualitativement de l'hôte. Un mécanisme de résistance n'a pas de « niveau » en soi. Il s'agit en « amplifiant » le niveau de sensibilité de la bactérie hôte.

5.2.2. Haut niveau de résistance aux aminosides (HNR)

Les streptocoques sont résistants aux aminosides car ceux-ci y pénètrent difficilement. Leur pénétration nécessite l'énergie d'un gradient de protons que ces bactéries ne produisent pas. Afin de détecter si la résistance est due à la non pénétration (bas niveau de résistance). Les aminosides doivent être, dans ce cas, testés à la fois avec les disques habituels et avec des disques très chargés.

Des souches d'entérocoques présentent un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI supérieur à 100 mg/ml). Ce HNR a été décrit chez les souches d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium*.

Il s'explique essentiellement par l'acquisition par la bactérie, de gènes plasmidiques ou transposables codant pour la synthèse d'enzymes modificatrices.

5.3. Résistance aux macrolides, lincosamines et streptogramines [4, 22]

5.3.1. Modification de la cible

➤ Mécanisme biochimique et déterminisme du phénotype MLS 3

Le mécanisme de cette résistance consiste en une altération spécifique et unique du ribosome bactérien. Les souches résistantes produisent une méthylase, responsable de la déméthylation d'une adénine dans PARN 23 S de la sous unité ribosomale 50-S. Cette altération ribosomale entraîne probablement des changements de conformation de l'ARN 23 S qui ont pour conséquence la réduction de l'affinité pour les macrolides, les lincosamines et les Streptogramine B, dont les sites de fixation sont communs ou se chevauchent, d'où le nom de phénotype MLS_B

➤ Expression de la résistance MLS_B et sa régulation

Si la résistance est inducible, il y a dissociation entre l'activité des macrolides en C₁₄ et celle des autres macrolides, des lincosamines, et des streptogramines.

Si la résistance est constitutive, la souche est résistante à l'ensemble des macrolides, des lincosamines et au seul facteur B des streptogramines. La régulation de la résistance est post-transcriptionnelle.

5.3.2. Inactivation des antibiotiques

Les antibiotiques du groupe MLS sont susceptibles d'être inactivés par différents enzymes.

Cependant, la résistance par inactivation n'est pas croisée entre les antibiotiques non apparentés cliniquement et elle est de faible fréquence.

Les enzymes concernées sont les estérases, acétylases, hydrolases et nucléotidases.

5.3.3. Imperméabilité

Les souches résistantes n'activent pas les antibiotiques, il y ajuste une diminution à l'accumulation intra cellulaire des macrolides. Cette résistance serait due à une modification du transport de macrolides en C₁₄.

5.4. Résistance aux quinolones : [4, 22, 29]

Les bactéries acquièrent une résistance exclusivement par mutation chromosomique. Ces mutations entraînent soit une modification de la cible, soit une interférence avec le transport de l'antibiotique.

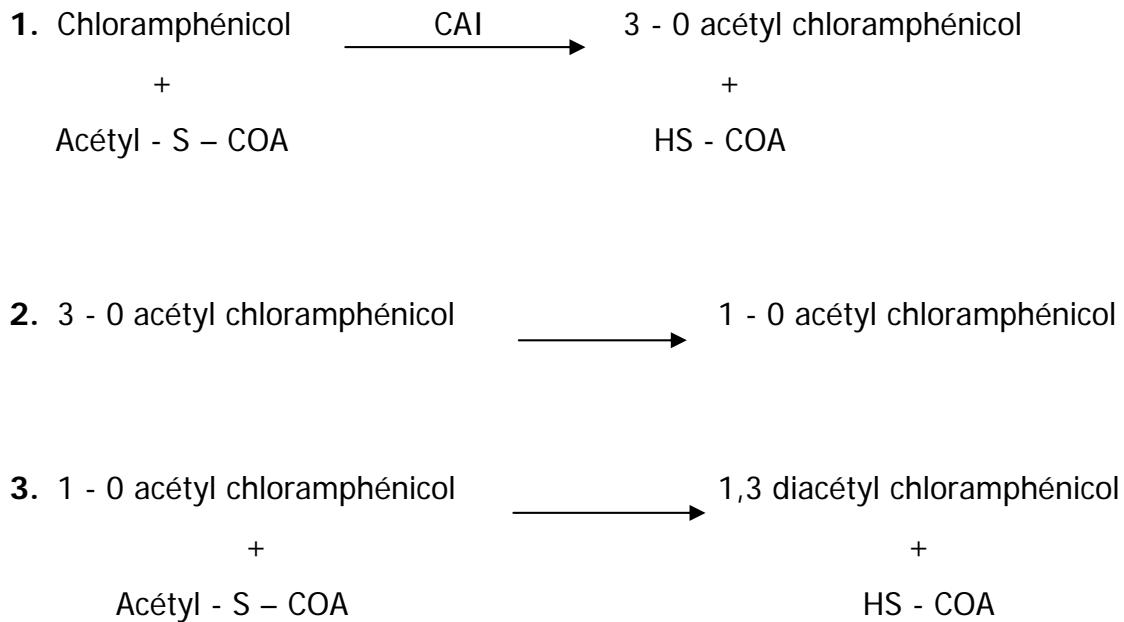
Trois types de mutations au niveau de l'ADN ont été décrites. La mutation NALA est la plus fréquente confère une résistance de haut niveau à l'acide nalidixique. La résistance est croisée entre les différentes quinolones.

5.5. Résistance aux tétracyclines [40]

Le principal mécanisme de résistance repose sur l'insuffisance de concentration intracellulaire en antibiotique ; le système actif de transport est en balance avec un système excréteur responsable de la résistance, celle-ci est surtout liée à une excrétion excessive d'antibiotiques à travers la membrane cytoplasmique, faisant intervenir la synthèse inductible, ou constitutive du système excréteur. Ce système de pompe régule négativement comporte 2 gènes ; celui de contrôle ou répresseur et celui de structure ou protéine TET.

5.6. Résistance aux phénicolés [4, 22, 40]

Le mécanisme de résistance plasmidique est surtout enzymatique et se fait par l'intermédiaire chloramphénicol - acétyl - transferase (CAI) qui inactive ces antibiotiques en C₃et C₁, avec comme cofacteur l'acétyl - coenzyme A, selon les 3 étapes suivantes :



Outre la résistance plasmidique par inactivation un autre mécanisme est en relation avec la diminution de perméabilité de la paroi entraînant une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (bêta-lactamines, aminosides, quinolones et triméthoprime).

5.7. Résistance vis à vis des sulfamides et des triméthoprimes

5.7.1. Résistance naturelle

La résistance naturelle aux sulfamides est définie par une CMI supérieure à 100 mg/l.

Parmi les souches résistantes, 90% ont une CMI supérieure à 2000mg/ml.

Un mécanisme possible de la résistance au triméthoprime pouvait être l'utilisation des folates exogènes, comme chez les entérocoques.

Les souches ayant une CMI supérieure ou égale à 2mg/l sont résistantes et celles dont les CMI sont supérieures à 100mg/l sont dites résistantes de haut niveau.

5.7.2. Résistance acquise

Il s'agit :

- soit de mutations chromosomiques
- soit d'une résistance codée par les plasmides

Tableau II : Mécanisme de résistance aux sulfamides et associées en fonction du déterminisme génétique

	Résistance chromosomique	Résistance plamidique
Sulfamides	Diminution de perméabilité, hyperproduction de PAD, hyperproduction de DAPS DHPS unité résistante	DHPS additionnelle Diminution de perméabilité
Triméthoprime	Diminution de perméabilité Auxotrophie en thymine hyperproduction de DHF unité résistante	DHFR additionnelle (au moins 3 types différents)

5.8. Résistance vis à vis de la vancomycine [22]

Le mécanisme de résistance des cocci reste inconnu. La tolérance a été décrite en 1977. Chez *Staphylococcus aureus*, elle serait croisée avec certains antibiotiques interférant avec la biosynthèse du peptidoglycane, comme les Bêta-lactamines, la fosfomycine et en relation avec un déficit du système mureine hydrolase.

CHAPITRE III : METHODE D'ETUDE DE LA SENSIBILITE DES BACTERIES AUX ANTIBIOTIQUES

Tout prélèvement bactériologique (hémoculture, ponction lombaire, pus...) doit être effectué avant l'instauration du traitement antibiotique et dans des conditions d'asepsie rigoureuse, afin d'avoir le maximum de chance d'isoler la bactérie responsable de l'infection et non un contaminant, et d'en étudier la sensibilité aux antibiotiques.

A partir de la bactérie isolée, des méthodes sont utilisées pour guider l'antibiothérapie ; elles sont généralement suffisantes pour la plupart des infections : Ce sont la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la réalisation de l'antibiogramme ; les autres évaluent l'effet bactéricide de l'antibiotique : ce sont la recherche de la concentration minimale bactéricide (CMB), l'étude du pouvoir des associations d'antibiotiques ; elles sont indispensables au traitement des infections sévères ou chroniques chez les patients aux moyens de défense diminués (immuno déprimés).

1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE ET ANTI BIOGRAMME

1.1. Définition

La CMI est la plus faible concentration d'un antibiotique donné capable d'inhiber toute croissance visible d'une bactérie.

1.2. Techniques manuelles

1.2.1. Technique par dilution en milieu liquide

Elle consiste à mettre en contact dans des tubes ou en microplaques [50] sous un même volume des concentrations croissantes de l'antibiotique étudié en présence d'une quantité définie d'un bouillon de culture contenant de 10^5 à 10^6 bactéries/ml (aucun trouble visible). Après une incubation de 18 heures à 37°C (30°C pour les staphylocoques avec les bêta-lactamines) le premier tube ou la première cupule pour le ou laquelle il n'y a plus de croissance visible correspond à la CMI.

La sensibilité ou la résistance peut être déterminée en microplaques en mettant la souche bactérienne en présence d'une ou deux concentrations de chaque antibiotique. Après 18h d'incubation à 37°C, on observe ou non la croissance bactérienne dans les cupules.

L'interprétation est faite en fonction des concentrations d'antibiotiques utilisés (les concentrations sont des normes appelées valeurs critiques ou « breakpoints »). Ces normes classent la souche en 3 catégories : sensible, résistante, intermédiaire.

1.2.2. Technique de dilution en milieu gélosé

Des concentrations croissantes de l'antibiotique sont réalisées. Chaque concentration est incorporée à un milieu gélosé.

Des boîtes de pétri peuvent être ensemencées avec plusieurs souches bactériennes à l'aide d'un ensemenceur multipoints [53]. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la formation de colonies visibles.

1.2.3. Technique de diffusion en milieu gélosé

➤ **Principe : [9, 20, 23]**

Des disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotiques sont disposés à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé avec une suspension de bactérie en phase exponentielle de croissance.

A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus qu'on s'éloigne de la source (gradient de concentration).

Après incubation (18h à 37°C), chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne : la multiplication des bactéries s'arrête là où existe dans la gélose une concentration d'antibiotiques égale à la CMI.

A partir de la mesure du diamètre d'inhibition on peut déduire la valeur affichée de la CMI.

Il existe en effet entre ces deux valeurs une relation établie au préalable par des études comparatives portant sur un grand nombre de souches (courbe de concordance).

Les résultats sensibles, intermédiaire ou résistant, sont calculés par rapport à des valeurs préétablies, soit de diamètres critiques (D_d) soit de concentrations critiques (C_C).

➤ Interprétation

	CMI (mg/l)	Diamètre (mm)	
CMI ≤ C	Souche sensible	Diamètre ≥ D _d	Souche S
CMI > C	Souche résistante	Diamètre < D _d	Souche R
CMI > C et ≤ C	Souche intermédiaire	Diamètre ≥ d et < D _d	Souche I

➤ Modalités pratiques de l'antibiogramme par diffusion en gélose

▪ Milieu de culture

On utilise une boîte de pétri contenant un gélose Mueller Hinton d'une épaisseur de 4mm pour les entérobactéries, les staphylocoques et *pseudomonas aeruginosa*.

Le milieu Mueller Hinton additionné de 5% de sang de cheval est utilisé pour les germes exigeants comme *streptococcus* et *Neisseria*.

- **Préparation de l'inoculum**

L'inoculum doit être de $2 \text{ à } 3.10^6$ bactéries /ml (UFC/ml).

Cela permet d'obtenir des colonies justes confluentes à partir d'une culture pure de 24 heures. De suspension se fait dans de l'eau physiologique stérile.

- **ensemencement du milieu**

A l'aide d'une pipette, on inonde la surface de la gélose avec la dilution déjà effectuée. Puis on enlève l'excès de liquide avant de sécher les boîtes à l'étuve 37°, pendant 15mn.

- **Application de disque et incubation :** les disques d'antibiotique sont déposés sur le gélose déjà inondée soit à l'aide d'un distributeur soit à l'aide d'un pince en appuyant légèrement. Les boîtes sont laissées 15mn à la température ambiante. L'incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

2. TECHNIQUE AUTOMATISÉES [10, 13]

C'est à partir de la croissance bactérienne, et de son inhibition que ces techniques, comme les précédentes évaluent la sensibilité ou la résistance des bactéries aux antibiotiques.

On distingue les systèmes à lecture uniquement tardive qui fournissent une réponse en 18h-24h (croissance bactérienne terminée), les systèmes à lecture uniquement rapide qui fournissent une réponse en 3h à 5h (croissance exponentielle) et les systèmes qui permettent les deux réponses.

2.1. Lecture de la croissance bactérienne

- **Techniques directes [10, 13]**

- **La Turbidimétrie :** Mesure le rayon transmis à travers bactérienne ; cette sensibilité est assez faible, elle ne détecte un trouble que lorsque la densité bactérienne atteint 10^7 bactéries/ml.

- **La Néphéломétrie** : Mesure la lumière diffractée, elle est plus sensible que la turbidimétrie.
- **La Photo-néphéломétrie** : Mesure à la fois l'absorption et la diffraction.

➤ **Technique indirecte [10, 13]**

Mesure des phénomènes liés à la croissance bactérienne. Ce sont par exemple l'importance électrique (trop dépendante du métabolisme et du milieu de culture), les variations de pH (trop sensible), le microcalorimétrie ou la consommation d'ATP. Les bactéries peuvent aussi être dénombrées par la cytométrie du flux.

2.2. Milieux utilisés et croissance bactérienne

Ces milieux doivent répondre aux mêmes exigences que ceux utilisés par la détection de CMI par des méthodes classiques notamment leur composition chimique doit être suffisamment définie.

Ils doivent permettre le développement de la plupart des espèces bactériennes cliniquement importantes. Les tests de sensibilité doivent être reproductives d'un lot à l'autre. Les milieux ne doivent pas être antagonistes des antibiotiques testés, ni être sujets à des variations de pH.

Pour les systèmes à lecture précoce, qui réalisent les antibiogrammes en moins de 5 heures la croissance bactérienne doit être rapide et régulière durant le temps de l'expérience : ceci nécessite des milieux riches et complexes.

L'agitation et l'aération sont également des facteurs très importants de la croissance et l'oxygénation est souvent trop limitée dans les appareils à lecture rapide.

2.3. Interprétation clinique de la CMI

La souche isolée est placée dans une des trois catégories suivantes :

- **Sensible** : La souche peut être atteinte par un traitement à dose habituelle par voie générale.
- **Résistante** : La souche ne pourra probablement pas être atteinte quel que soit le type de traitement.
- **Intermédiaire** : La souche pourra être atteinte par un traitement local, une augmentation des doses par voie générale ou une concentration physiologique particulière (urine, bile...) ou par une association synergique d'antibiotiques

Cette interprétation résulte de la confrontation de données d'ordre différent :

- **Bactériologiques**

Une souche microbienne ou un bactérie est aussi considéré comme résistante quand elle tolère une concentration d'un antibiotique significativement plus élevée que celle qui inhibe la croissance de la majorité des autres souches de la même espèce ou des individus de la même culture [11].

- **Pharmacologiques**

« Un organisme est considéré comme résistant quand la concentration d'un antibiotique qu'il est capable de supporter est significativement plus élevée que la concentration obtenue in vitro » [11].

- **Cliniques et expérimentations animales [11]**

3. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE BACTERICIDE (CMB)

3.1. Définition

La CMB est la plus faible concentration d'antibiotiques qui laisse subsister une proportion des bactéries de l'inoculum inférieure à 10^{-4} (moins de 0,01%) après 18h d'incubation à 37°C.

3.2. Principe de la technique [8, 41]

La détermination s'effectue conjointement à celle de la CMI en milieu liquide, un bouillon contenant un inoculum bien standardisé (10^6 bactéries/ml) est réparti en quantités aliquotes dans une série de tubes.

Des dilutions croissantes de la solution de l'antibiotique à tester sont distribuées dans les tubes ; ceux contenant les concentrations égales ou supérieures à la CMI ne présentant pas de culture visible après 18 heures d'incubation à 37°C sont repiqués en stries parallèles à l'aide d'une anse calibrée sur un milieu gélosé dépourvu d'antibiotiques.

Après une nouvelle incubation de 18 heures à 37°C, la proportion de bactéries survivantes est appréciée en comparant le nombre de bactéries obtenues avec ceux que donne l'inoculum bactérien de départ aux dilutions 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} .

Des cupules de microplaques peuvent être utilisées ; elles sont répliquées avec un appareil automatique et des tiges calibrées à un μl . Seule une proportion de survivants de l'ordre de 10^{-3} peut alors être décelée.

La température d'incubation est de 30°C pour les staphylocoques à cause de la résistance hétérogène.

3.3. Intérêts

- **Pour les antibiotiques bactéricides** (Bêta-lactamines, aminosides, polymixines, quinolones) la CMB est proche de la CMI et est facilement atteinte dans l'organisme (le rapport CMB/CMI est égal au maximum à 4)
- **Pour les antibiotiques bactériostatiques** (tétracyclines, macrolides, synergistines, et phenicolés), la CIM est très proche de 4.

Il arrive que des antibiotiques à mécanisme bactéricide et dont la cible est la synthèse des constituants de la paroi (Bêta-lactamines, vancomycine) aient une CMI basse mais une CMB élevée (rapport CMB/CMI=32) sur certaines souches bactériennes (parmi les staphylocoques, listeria, pneumocoques) ; celles-ci sont déficientes en autolysines de la paroi.

Dans les infections sévères (Septicémies, endocardites, méningites purulentes...) chroniques (ostéomyélites...) ou survenant chez les sujets fragilisés aux moyens de défense diminués (aplasie, Sida...), un simple effet bactériostatique ne suffit plus, il est alors indispensable de connaître l'activité bactéricide des antibiotiques sur la souche bactérienne responsable de l'infection.

DEUXIEME
PARTIE :
Travail
Personnel

CHAPITRE I : CADRE DE L'ETUDE

Il s'agit d'une étude rétrospective allant du 1^{er} Août 1997 au 30 septembre 2002, faite dans le laboratoire de Bactériologie de l'hôpital régional de Saint-louis.

Cet hôpital dispose des services qui accueillent les malades hospitalisés ainsi que des malades pour les consultations externes. Les différents services sont :

La pédiatrie, la médecine générale, la chirurgie, la réanimation et la maternité. Le laboratoire de Bactériologie fait partie du service de Biologie qui englobe la biochimie, l'hématologie et la parasitologie. Le laboratoire comprend trois pièces séparées les unes des autres par des portes. On a :

→ **Une salle de prélèvements**

→ **Une salle de laverie**

→ **Une salle de manipulation avec les paillasses suivantes :**

- Examen cytobactériologique des urines (ECBU) et prélèvements vaginaux (PV)
- Hémoculture, coproculture, LCR et lecture de Spermogramme
- Enfin une paillasse qui sert à ensemencer les milieux de culture et à la recherche des Bacilles de Kock (BK)

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Matériels pour l'isolement et l'identification

1.1.1. Milieux de culture

- **Milieux de culture pour l'isolement**

Gélose CLED

Gélose EMB

Gélose Chapman

Gélose sabouraud

Gélose GSO

Gélose GSN

- **Milieux de culture pour l'identification**

Galerie réduite

Kligler

Mannitol – mobilité

Urée

Citrate de simmons

Eau peptonée simple

Muller Hinton (MH)

Galerie complète

API 20 (laboratoire Pasteur Mérieux)

API NE (laboratoire Pasteur Mérieux)

1.1.2. Réactifs pour les tests complémentaires

- TDA
- Kovacs
- Eau oxygénée
- Disque d'oxydase
- Disque d'ONPG

Le laboratoire dispose de :

2 naphtol

KOH

Mais non utilisés dans le diagnostic

Il convient de signaler que ces réactifs sont laissés sur la paillasse.

1.1.3. Sérum utilisés

Latex disponibles

Anti PNO

Anti HIB

Anti MGO, A,B,C

Anti strepto, A,B,C, G, F

Sérum anti agglutinants, antishigelle

Anti *shigella sonnei*

Anti *shigella flexneri*

Anti *shigella dysenteriae* A1

Anti *shigella dysenteriae* A2

Anti *shigella boydii*

- Sérum agglutinants anti salmonelles

0 : 6,7,8 Fév. 91

0 : 1, 2 Oct. 93

0 : 4, 5 Mars 93

0 : 13, 22, 23 Fev. 90

0 : 3, 10, 15 Mai 91

0 : 9 Jan 91

OMA Avril 00

OMB Avril 00

Vi Avril 92

Anti paratyphi A septembre 89

Anti paratyphi B

Anti paratyphi C

H : i Mai 93

H : d Nov. 93

H : r Fev. 91

H : g, m Nov. 93

- Sérum EPEC : sérum trivalent O₁₁₄ · O₁₄₂ · O₁₂₄

1.2. Matériels pour l'antibiogramme

1.2.1. Milieux utilisés

- Gélose Muller Hinton
- Boite de pétri

1.2.2. Antibiotiques utilisés

→ Pour les *Pseudommas*

- AZT
- CTR ou Ceftazidim = antipyocyanique
- -GEN
- CS si urines
- IMP si Pseudommas dans l'hémoculture

C, Sxt, Amox, Penicillines car sont résistants selon les techniciens.

→ Pour les streptocoques

- TE
- C
- SXT
- AMOX
- E si allergies aux Pénicillines, infection pulmonaire.
- Pas de quinolones

→ Ox Pour *Streptococcus pneumoniae*

→ Pour les staphylocoques

- OX
- TE
- C
- SXT

- PT (diffusion osseuse)
- CIP (systémique)
- E (si infection cutanée)
- GEN (si infection systémique)

Pas de Noroxine car staph résistant

Pas de Céphalosporines

→ Pour les Entérobactéries

- TE
- C
- AMOX
- NOR
- NA
- SXT
- CTR

→ Pour *Streptococcus pneumoniae*

- OX (pour voir sensibilité aux pénicillines)
- C
- CRO
- AMOX
- CIP

→ Pour *Haemophilus influenzae*

- CRO
- C
- AMOX
- SXT

→ Pour *Neisseria meningitidis*

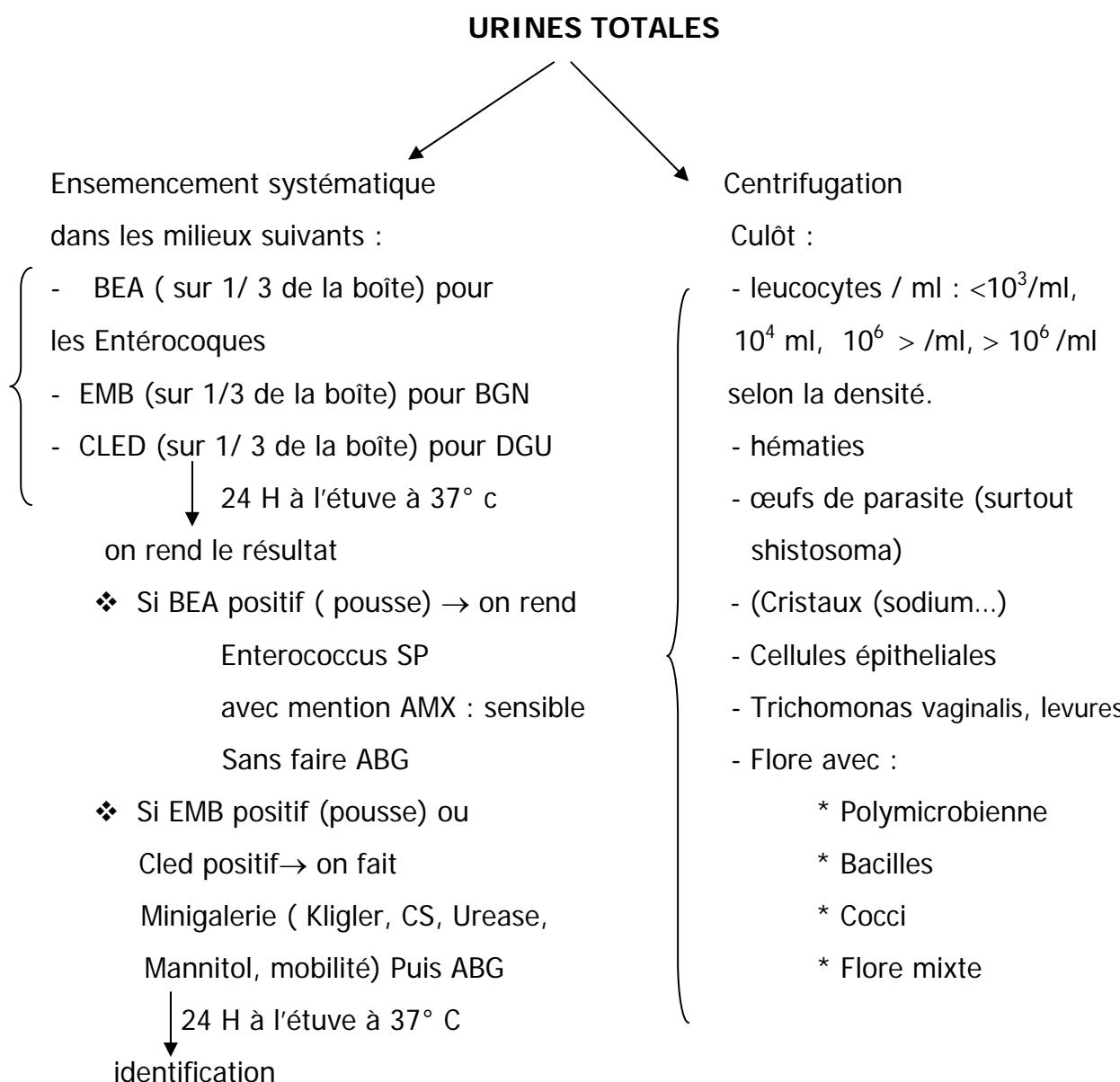
- AMOX
- C
- CTX
- GEN
- SXT

2. Méthodes

Nous avons répertorié au laboratoire de bactériologie de l'hôpital régional de Saint-louis toutes les analyses faites durant une période de cinq ans (1^{er} Août 1997 – 30 septembre 2002)

Ce travail a été exécuté grâce à l'exploitation des différents registres d'analyses disponibles dans le laboratoire. L'isolement et l'identification de tous les pathogènes bactériens, des échantillons d'urines PUS, LCR, PV et PU, Coproculture, hémoculture de sang, ont été fait conformément aux méthodes que nous allons exposer dans les différentes figures : (2, 3, 4, 5, 6, 7).

2.1. Traitement des urines



FIGURES 2 : Traitement des urines (ECBU)

Remarques

Remarque 1 :

Parfois si

- ❖ EMB pousse avec un aspect de « reflet métallique », ainsi, *Escherichia. Coli* est rendu et on fait l'anbiogramme sans faire de minigalerie d'identification.
- ❖ Si les colonies apparaissent muqueuses, on rend *Klebsiela* sp et on fait l'antibiogramme sans faire de minigalerie.

Remarque 2 :

Pour la lecture du DGU, on procède de la manière suivante :

- ❖ Si les urines sont troubles, on utilise une anse platine calibrée pour la circonstance approximativement. On prend une öse d'urines totales dans 1 ml d'eau physiologique puis on ensemence sur Cled à partir d'une öse sur 1/3 de Cled.
- ❖ Si les urines sont claires, parfois on ensemence Cled sans faire de DGU.

Remarque 3 :

Les prélèvements d'urines se font chez les femmes venues pour PV et ECBU.

Remarque 4 :

A la réception des prélèvements, c'est au aide laborantin qui fait l'ensemencement, GRAM, EF, de tous les produits pathologiques. Le technicien supérieur, se charge le lendemain de faire l'identification des germes.

2.2. Traitement des selles

COPROCULTURE

- aspect macroscopique des selles
- ensemencement des milieux suivants
 - ❖ SS (1/2boîte de pétri)
 - ❖ BS (en tube)
 - ❖ HE (1/2boîte de pétri)

↓
24 h à l'étuve

(1) { BS → SS
BS → HE } Sur l'autre moitié de la boîte

(2) 2 à 3 minigaleries si colonies suspectes (lactoses -, SH2 ±)

- Uréase
- Kligler
- CS
- Mannitol-Mobilité

↓
lecture des minigaleries

- éventuellement autres minigaleries si colonies suspectes après repiquage

↓
Identification

Si enfant, on ensemence en plus un EMB

↓
24 H à l'étuve à 37 °c

Si reflet métallique → agglutination par sérum anti EPEC.

- ❖ Sérum disponible = sérum trivalent O₁₁₄ O₁₄₂ O₁₂₄
- ❖ Pas de galerie d'identification

Si reflet métallique, on présume E. Coli

FIGURE 3 : Examen de selles (Coproculture)

2.3. Traitement du LCR

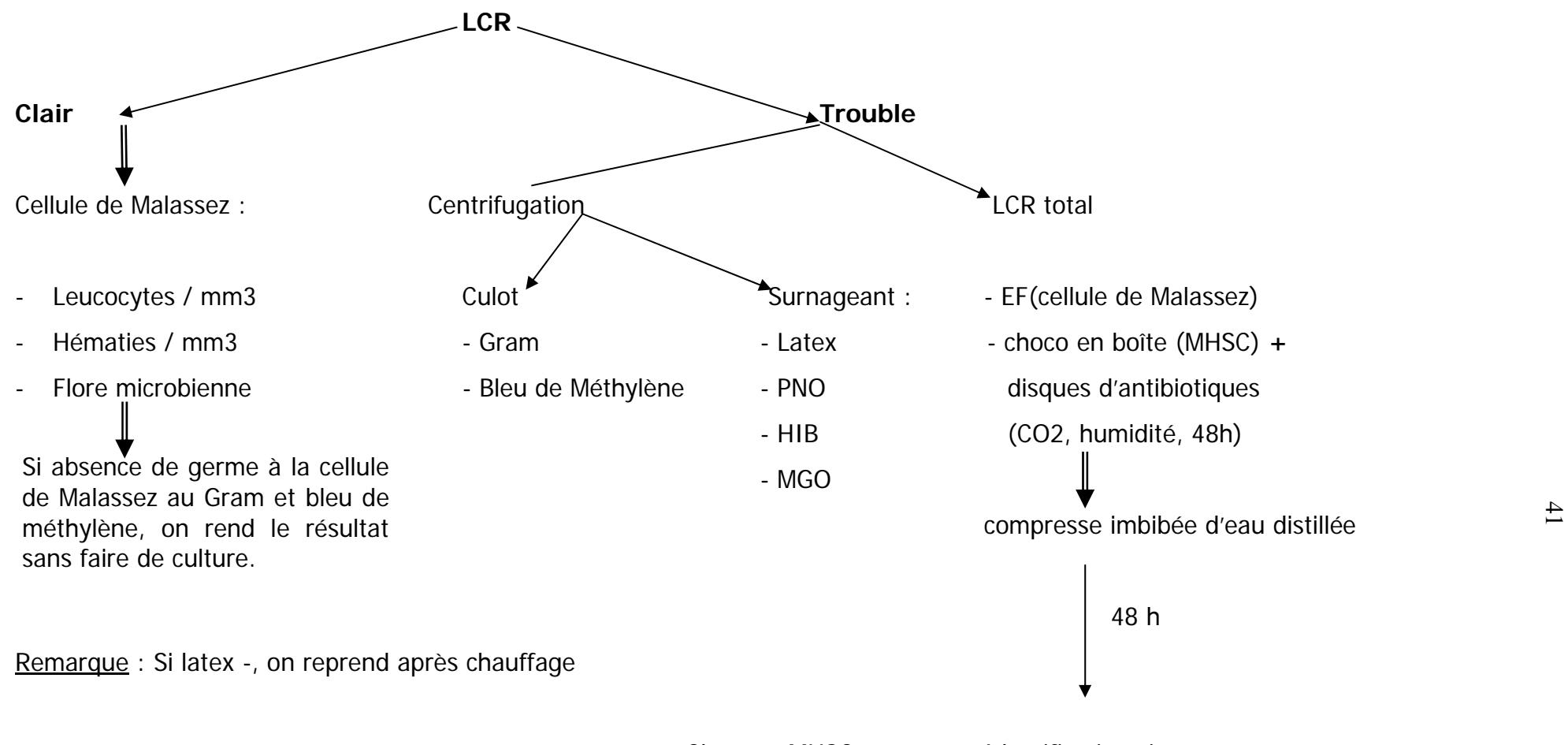
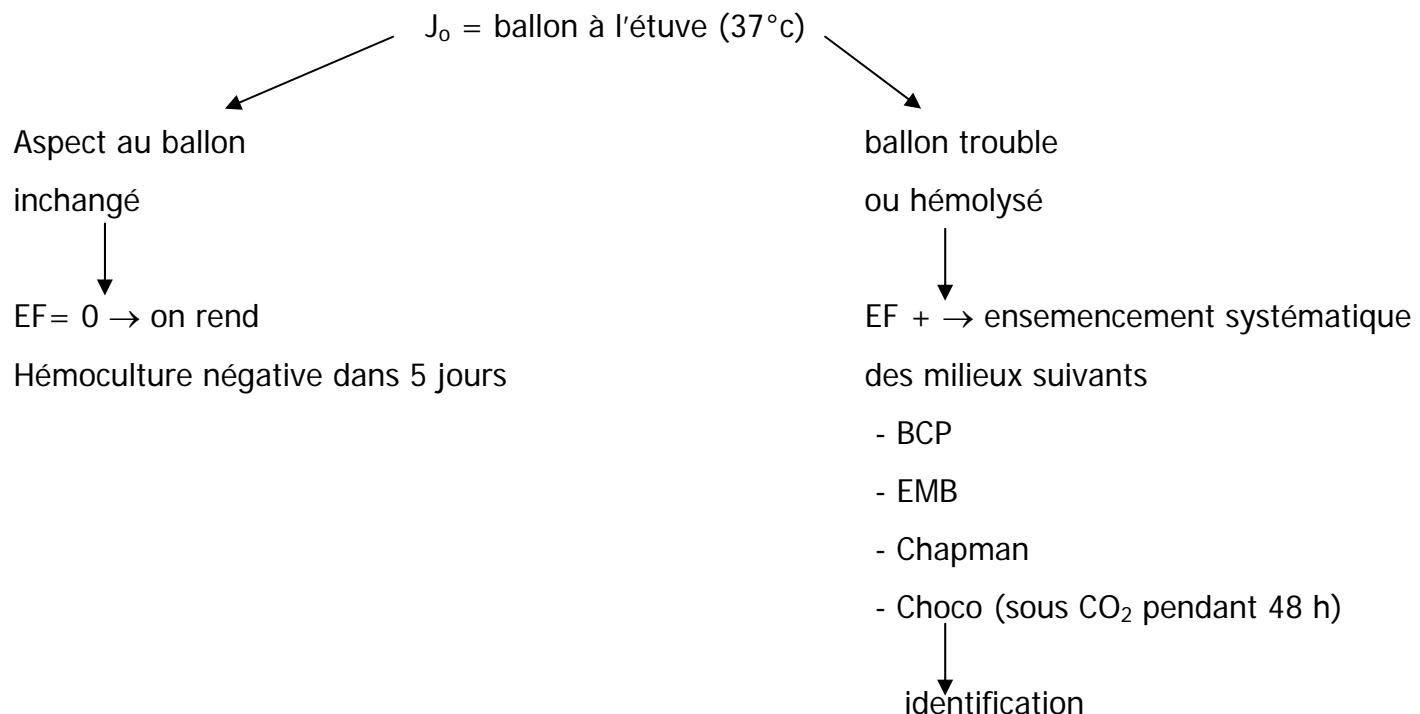


FIGURE 4 : Traitement du LCR

2.4. Traitement des hémocultures

HEMOCULTURE



- pas de repiquage systématique à J_3 , J_5 , J_{10}
- durée d'incubation des ballons (10J) n'est toujours respectée
- ballons souvent souillés
- renseignements chimiques souvent absents.

42

FIGURE 5 : Traitement du sang (hémoculture)

2.5. Traitement des prélèvements vaginaux

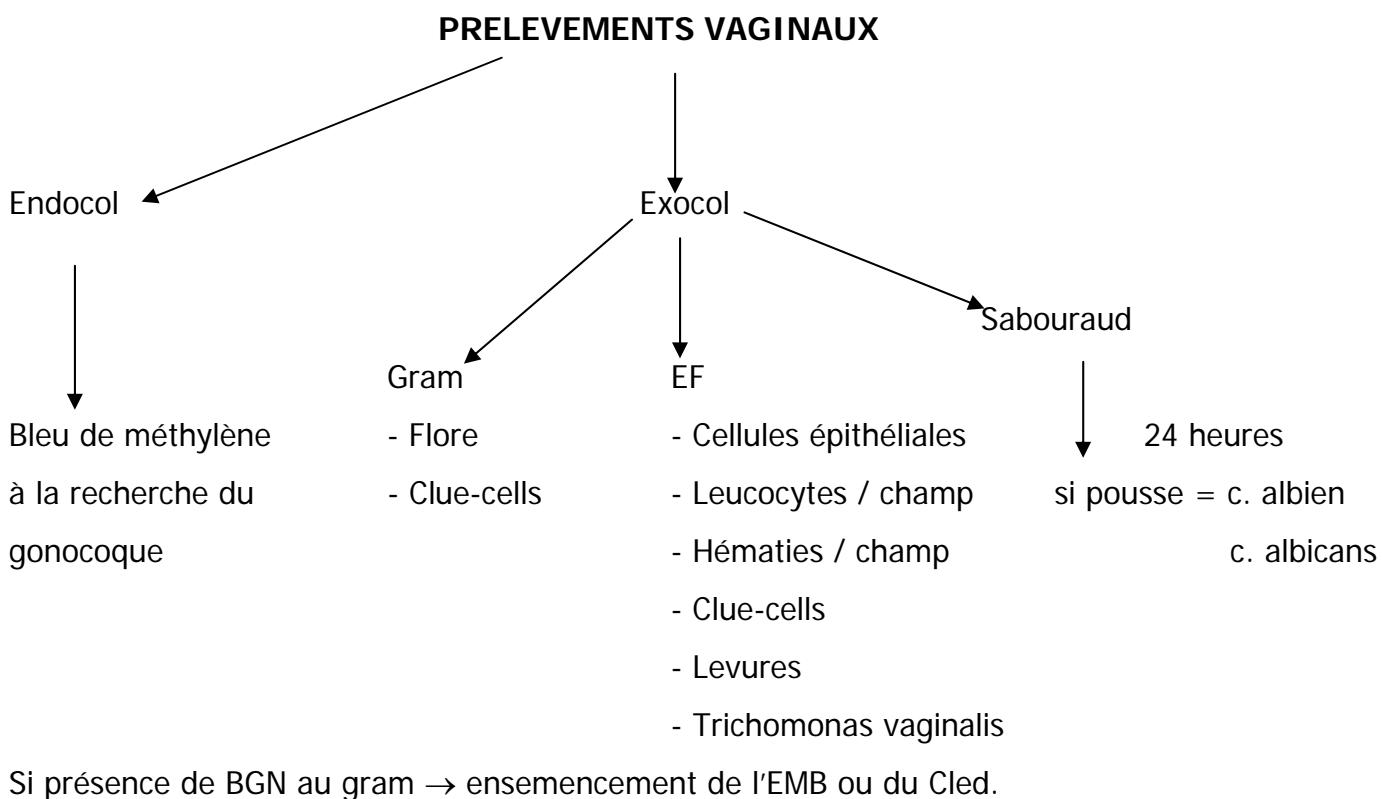
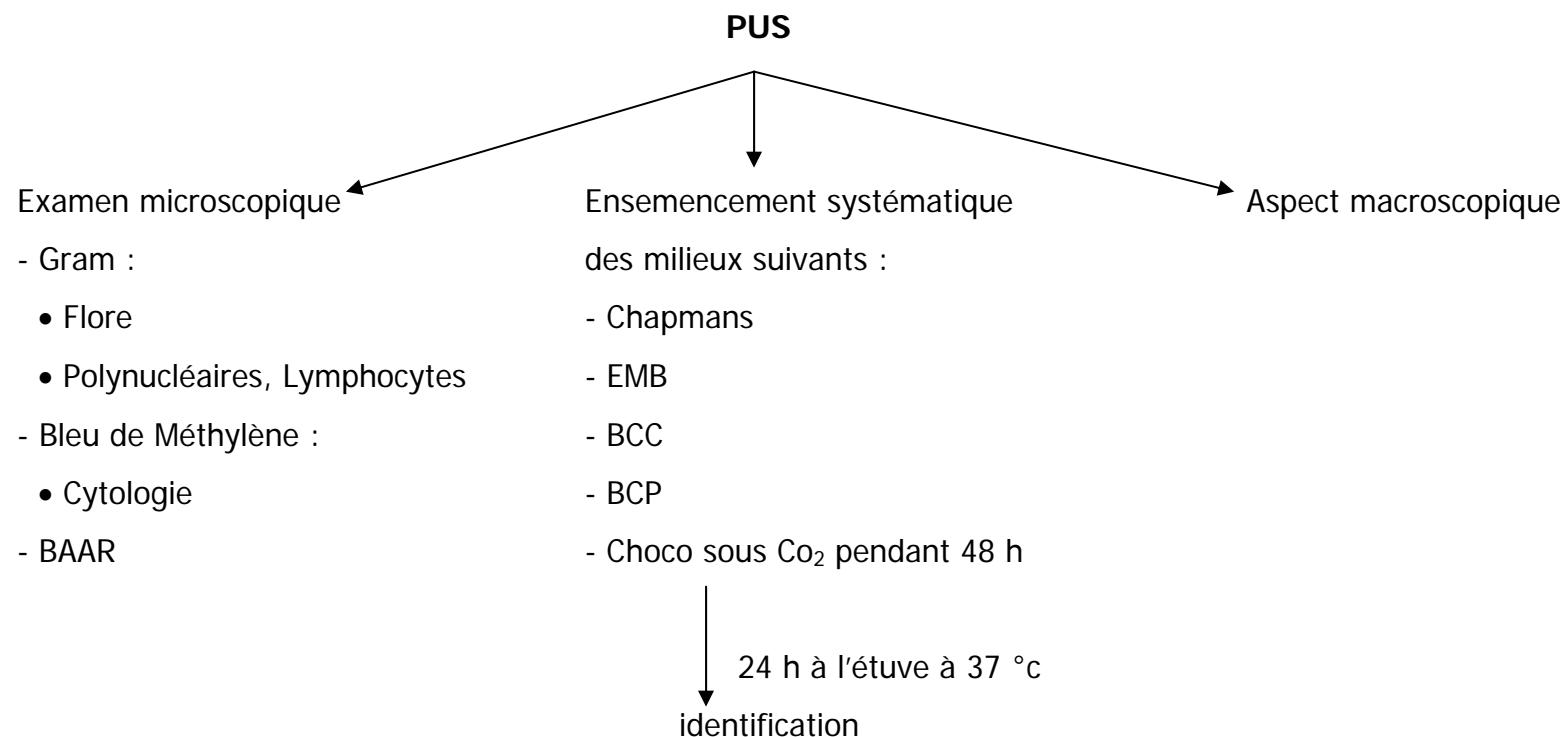


FIGURE 6 : Traitement des prélèvements vaginaux

2.6. Traitement des pus



Si LA, LP → cellule de Malassez Rivalta

FIGURE 7 : Traitement des pus

CHAPITRE III : RESULTATS

3.1. Résultats globaux

Au total, 11.478, analyses ont été faites dont :

- 7198 pour l'ECBU soit 62,71%
- 2238 pour la coproculture soit 19,49%
- 811 pour le LCR soit 7,06%
- 532 pour l'hémoculture soit 4,63%
- 699 pour les Pus soit 6,08 %
- 229 pour les PV et PU soit 1,99%

Parmi ces analyses, 3078 germes sont isolés soit 26,81% du nombre total d'analyses.

Parmi ces germes isolés nous avons :

- 1618 germes pour l'ECBU soit 22,48% de positivité
- 383 germes pour la coproculture (17,11%)
- 178 germes pour le LCR (21,95%)
- 174 germes pour l'hémoculture (32,71%)
- 664 germes pour les Pus (95%)
- 61 germes pour les PV et PU (26,64%)

3.2. Répartition des germes par produit pathologique

Cette répartition est représentée dans le tableau III.

3. REPARTITION DES GERMES PAR SERVICE

Tableau III : Répartition des germes isolés par service

Souches ↓ Paillasses →	ECBU		Coproculture		LCR		Hémoculture		PV-PU		Pus	
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%
<i>Escherichia coli</i>	739	45,67	25	6,53	00	00	18	10,34	02	3,28	63	9,49
Proteus	98	6,06	00	00	00	00	00	00	00	00	53	7,98
Klebsiella	320	19,78	00	00	00	00	62	35,63	02	3,28	101	15,21
Pseudomonas	87	5,38	00	00	00	00	02	1,15	01	1,64	114	17,17
Staphylocoque	62	3,83	00	00	00	00	39	22,41	04	6,56	227	34,19
Providencia	22	1,36	00	00	00	00	00	00	00	00	05	0,75
Enterobacter	85	5,25	00	00	00	00	12	6,90	01	1,64	18	2,71
Enterococcus	117	7,23	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00
Shigelles	00		302	78,85	00	00	00	00	00	00	00	00
Salmonelles	00		51	13,3	00	00	00	00	00	00	02	0,30
Streptocoques	00		00	00	43	28,65	05	2,87	15	24,59	60	9,04
<i>Neissera gonorrhoeae</i>	00		00	00	00	00	00	00	36	59	00	00
<i>Neisseria meningitidis</i>	00		00	00	56	44	00	00	00	00	00	00
Hib	00		00	00	29	20,66	00	00	00	00	00	00
<i>Vibrocholerae</i>	00		03	0,78	00	00	00	00	00	00	00	00
Autres germes	88		02	0,52	50	8	36	20,68	00	00	21	3,2
Total	1618	100	383	100	178	100	174	100	61	100	664	100

3.2.1. L'ECUB

Pour l'ECUB, nous avons 1618 germes dont les plus représentatifs sont :

- *Escherichia coli* (n=739) soit un pourcentage de 45,67% du nombre total de germes (N=1618)

Puis les klebsielles viennent avec 19,78% avec comme espèce prédominante *klebsielle pneumoniae* (n = 253) représente 79,06 % des kelbsielles.

Ensuite nous avons les entérocoques et les Proteus qui représentent respectivement 7,23% et 6,06%.

3.2.2. Coproculture

383 germes ont été isolés avec comme germes prédominants :

- Les Shigelles (n = 382) soit 78,85% avec *Shigella dysentériae* A₁ qui culmine à 39,40% des Shigelles.

Enfin le Salmonelles suivent avec 13,3%

3.2.3. LCR

150 germes ont été isolés, les plus fréquents sont :

- *Nesseria méningitidis* (n = 66) soit 44% ; le Serogroupe le plus retrouvé est mesingo A (n = 53) soit 80% des meningocoques A. Les meningocoques B et C représentent (n = 5) soit 7, 57 % enfin le meningo M représente (n =1) soit 1,51%. Les streptocoques viennent ensuite avec 28,66%. *Haemophilus influenzae* représente 20,66 %.

3.2.4. Hémoculture

174 germes sont isolés avec comme germes prédominants les Klebsielles (n = 62) soit 35,63% des germes isolés. Parmi les Klebsielles, *Klebsiella pneumoniae* est plus fréquent avec 41 germes soit 66,13% des Klebeielles.

Les staphylocoques (n= 39) font 22,41% avec comme espèce prédominante *Staphylococcus aureus* (n= 22) soit 56,41%.

3.2.5. Pus

Au total 664 germes ont pu être isolés dont

- Les Staphylocoques (227 soit 34,19%)
- Les Pseudomonas (114 soit 17,17%)
- Les Klebsielles (101 soit 15,21%)
- E. Coli (63 soit 9,49%)

3.2.6. PV-PU

61 germes sont isolés dont le germe le plus représentatif est *Neisseria gonorrhoeae* (n = 36) avec un pourcentage de 59,02% .

3.3. Répartition des germes par Service

Le tableau IV résume la répartition des germes dans les différents services que compte l'hôpital.

Tableau IV : Répartition des germes isolés par produit pathologique

Services → Souches ↓	Externes		Pédiatrie		Médecine générale		Chirurgie		Maternité		Réanimation		Total
	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb	%	Nb
<i>Escherichia coli</i>	553	44,56	58	14,28	64	26,34	19	20,43	83	59,28	07	8,75	784
Enterococcus	65	5,24	08	1,97	20	8,23	13	13,97	04	02,86	07	8,75	117
Klebsiella	182	14,66	78	19,21	41	16,87	27	29,03	30	21,43	26	32,5	384
Enterobacter	64	5,16	15	3,69	05	2,05	05	5,38	06	4,28	03	3,75	98
Shigelles	138	11,12	88	21,67	60	24,69	03	3,22	05	3,57	08	10	302
Salmonelles	18	1,45	26	6,40	06	2,46	00	00	01	0,71	00	00	51
Streptocoques	15	1,21	42	10,34	02	0,82	00	00	00	00	02	2,5	61
Staphylocoques	58	4,67	18	4,43	13	5,34	00	00	05	3,57	11	13,75	105
Pseudomonas	32	2,58	04	0,98	14	5,76	21	22,58	05	3,57	14	17,50	90
Proteus	61	4,91	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	61
Providencia	09	0,72	02	0,49	05	2,06	04	4,30	01	0,71	01	1,25	22
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	35	2,82	00	00	00	00	01	1,07	00	00	00	00	36
<i>Neisseria meningitidis</i>	08	0,64	37	9,11	13	5,35	00	00	00	00	00	00	58
Hib	00	00	30	7,38	00	00	00	00	00	00	01	1,25	31
<i>Vibrio cholerae</i>	03	0,24	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	03
Total	1241	100	406	100	243	100	93	100	140	100	80	100	

3.3.1. Prélèvements externes

Escherichia coli est plus présente avec n = 553 soit 44,56% du nombre total de souches isolées de patients externes (N=1241).

Les klebsielles et les shigelles représentent respectivement 14,66% et 11,12 %.

3.3.2. Pédiatrie

Les Shigelles culminent avec n = 88 soit 21,67%, viennent ensuite les Klebsielles avec (n = 78) soit 19,21% enfin *Escherichia coli* (n = 58) représente 14, 28 % du nombre total de prélèvements pédiatriques.

3.3.3. Médecine générale

Escherichia coli est le plus fréquent avec (n = 64) soit 26,34% de germes isolés dans ce service (N = 243).

Ensuite viennent les Shigelles (n = 60) soit 24,69% quant aux Klebsielles ils représentent (n = 41) soit 16, 87%

3.3.4. Chirurgie

En chirurgie, les Klebsielles viennent en première position avec 27 germes soit 29,03% du nombre total de germes isolés dans ce service (N = 93). On a aussi les Pseudomonas (n = 21) soit 22, 58%, *Escherichia coli*(n = 19) soit 20, 43%.

3.3.5. Maternité

Escherichia coli est plus fréquent avec (n = 83) soit 59,28% du nombre total de germes isolés dans ce service (N = 140).

Nous avons aussi les Klebsielles avec (n = 30) soit 21, 43% .

3.3.6. Réanimation

Les Klebsielles culminent avec 26 germes soit 32,5% du nombre total de germe isolés dans ce service (N = 80) .

Ensuite viennent les Pseudomonas et les staphylocoques qui représentent respectivement 17, 50% et 13, 75%.

3.4. Sensibilité aux Antibiotiques des germes isolés par produit pathologique

3.4.1. ECBU

Avec *Escherichia coli* qui d'ailleurs est le plus représentatif, nous avons une sensibilité de 20,96 % pour l'amoxicilline, 52,59% pour l'association amoxicilline + acide clavulanique.

Escherichia coli a une sensibilité de 91,65 % pour acide nalidixique, 96,09% pour norfloxacine et 99,01% pour la ceftriaxone.

Sa sensibilité est représentée à la figure 8.

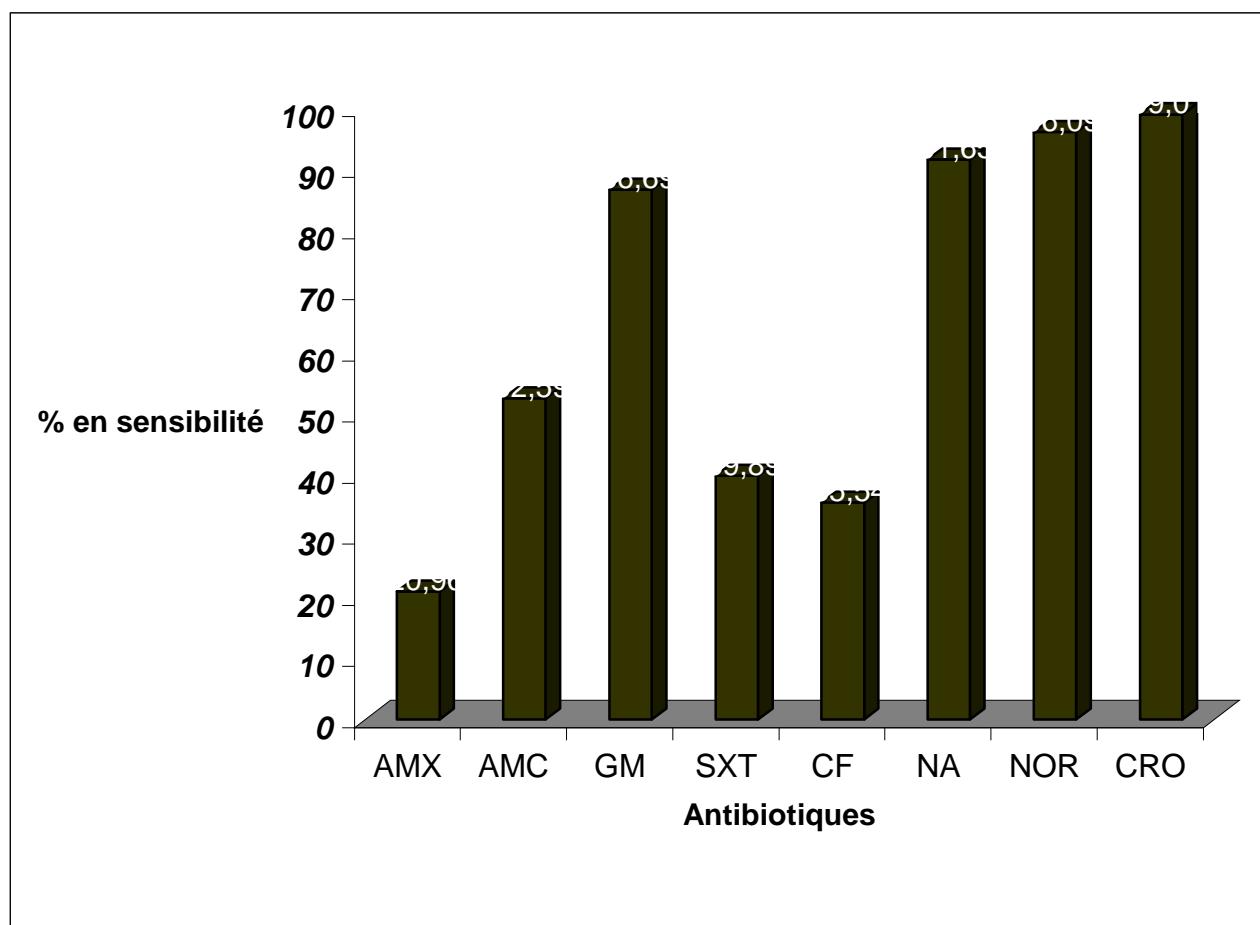


Figure 8 : Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Escherichia Coli* isolé en ECBU

Avec les Klebsielles, nous avons une sensibilité de 84% pour ceftriaxone et 91,46% pour Norfloxacine. Leur sensibilité est représentée à la figure 9.

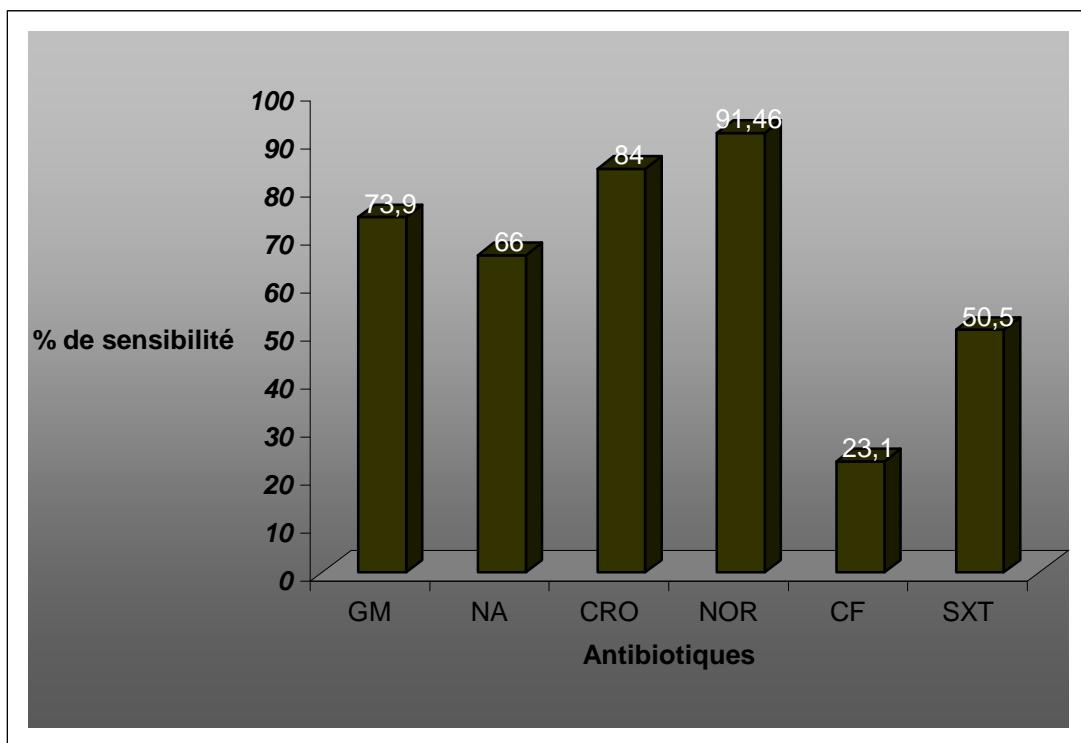


Figure 9 : Sensibilité des souches de Klebsielles isolées en ECBU

3.4.2. Coproculture

- Pour les Shigelles, représentées à la figure 10, leur sensibilité est de 19,8% pour l'amoxicilline + acide clavulanique. Leurs sensibilités est aussi de 97,2% pour l'acide nalidixique, 98,6% pour ceftriaxone et 99,3 pour ciprofloxacine alors qu'avec la norfloxacine nous avons une sensibilité de 100%.

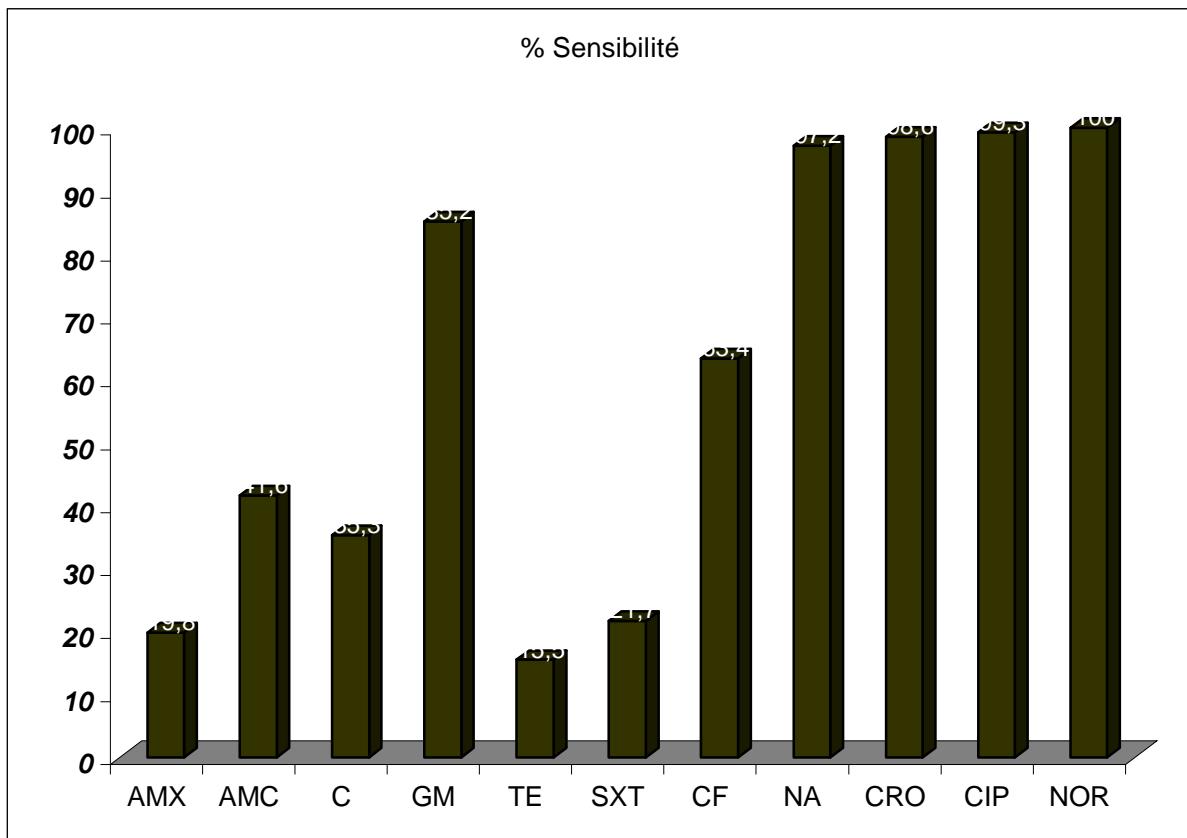


Figure 10 : Sensibilité des Shigelles isolées en coproculture

- Pour les Salmonelles représentées, à la figure 11, nous avons une sensibilité de 95,6% avec le Chloramphénicol alors que nous avons une sensibilité de 100% avec ceftriaxone, ciprofloxacine et norfloxacine.

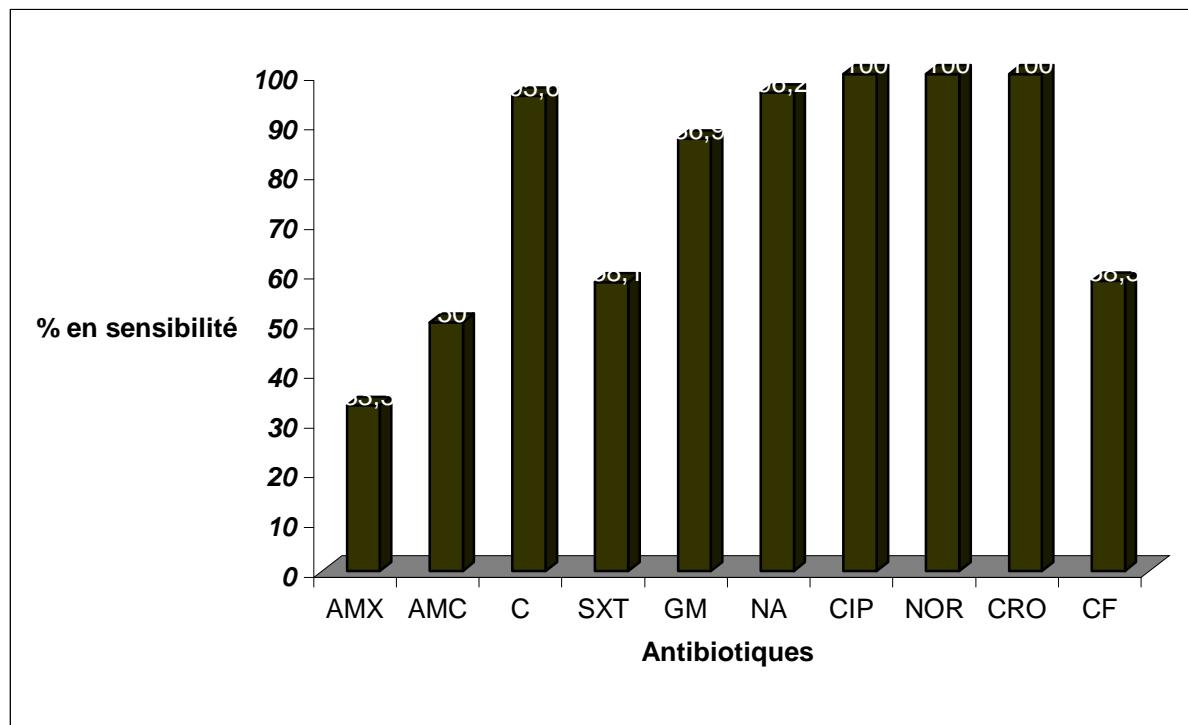


Figure 11 : Sensibilité des Salmonelles isolées en coproculture

3.4.3. LCR

Les sensibilités de *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae*, sont représentées aux figures 12 et 13.

L'amoxicilline possède une activité de 76% pour *streptococcus pneumiae* et 100% pour *Neisseria meningitidis*. De même le ceftriaxone possède une activité de 100% pour *Neisseria meningitidis*.

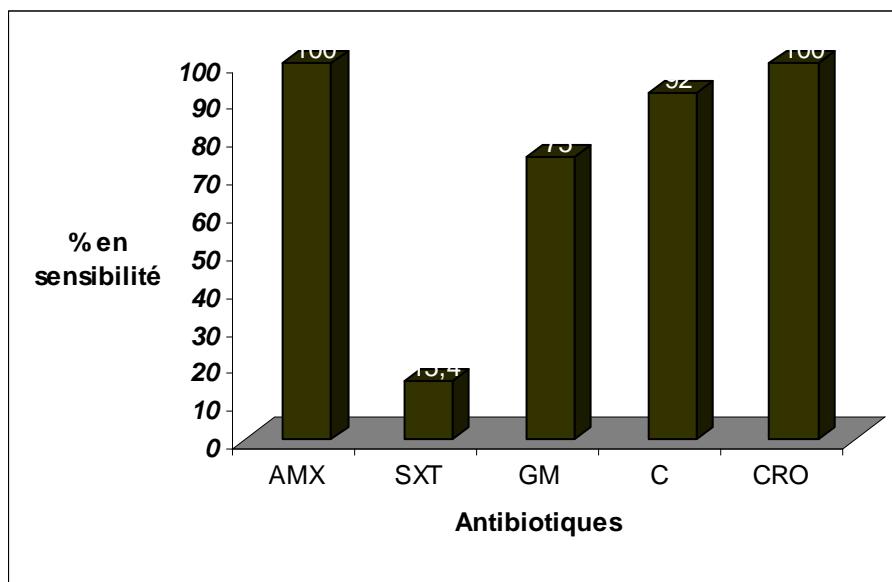


Figure 12 : Sensibilité des germes de *Neisseria meningitidis* isolés dans LCR

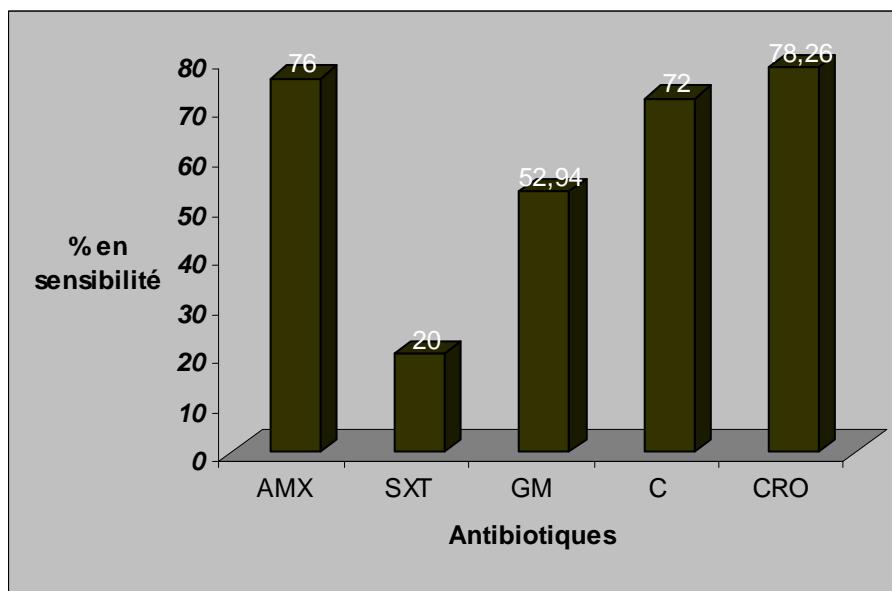


Figure 13 : Sensibilité des germes de *Streptococcus pneumoniae* isolés dans LCR

3.4.4. Hémoculture (voir figure 14)

Les germes qui sont fréquents sont *staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* l'oxacilline n'inhibe que 25% des souches de *Staphylococcus aureus*

Avec la gentamicine, nous avons 20% de souches sensibles pour *Klebsiella pneumoniae* et 100 % pour *Staphylococcus aureus*.

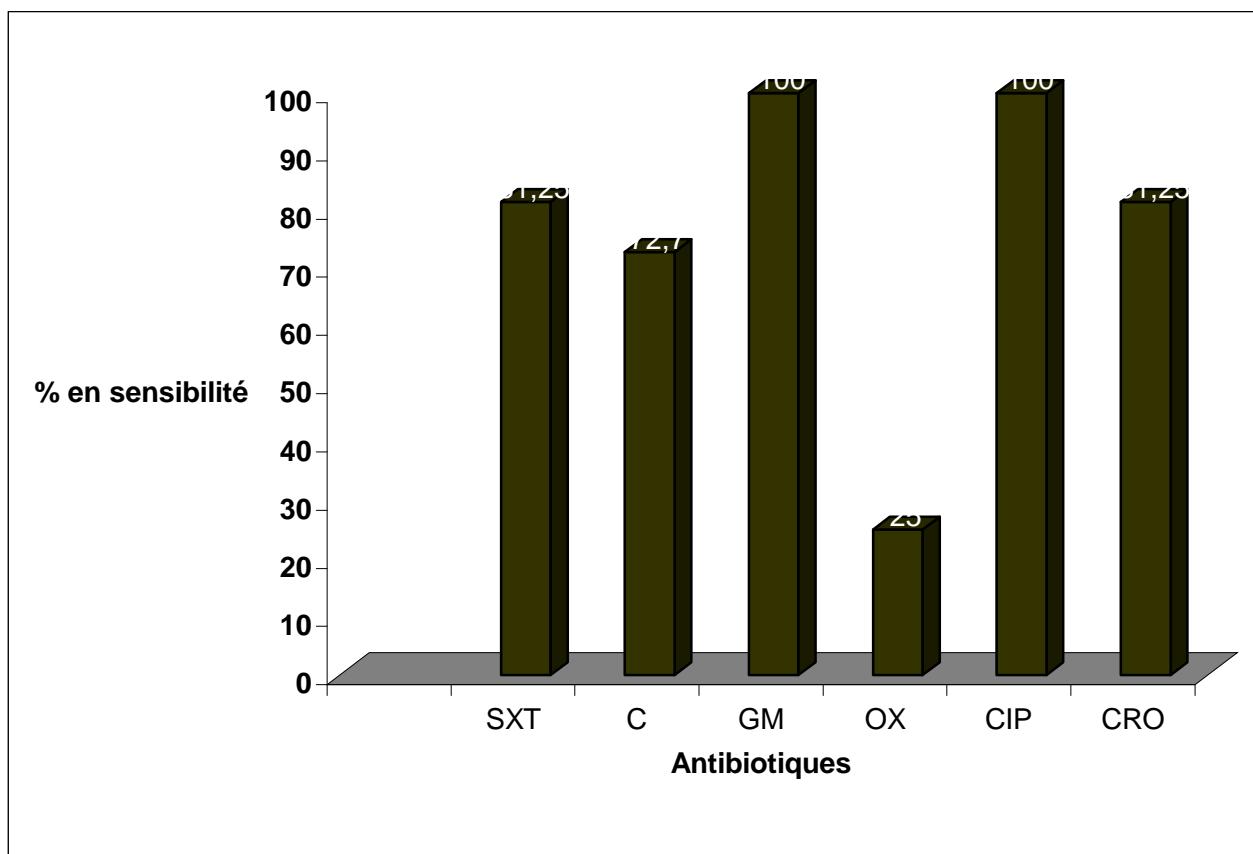


Figure 14 : Sensibilité de *Staphylococcus aureus* isolés en hémoculture

3.4.5. PUS

Pseudomonas aeruginosa est sensible à 56,7% à la gentamicine, alors que *Staphylococcus aureus* est sensible à 79,2% à la gentamicine.

Staphylococcus aureus est sensible à 59,2% à l'Erythromycine alors *Pseudomonas aeruginosa* est totalement résistant à l'Erythromycine.

Pour plus de détails voir figure 15.

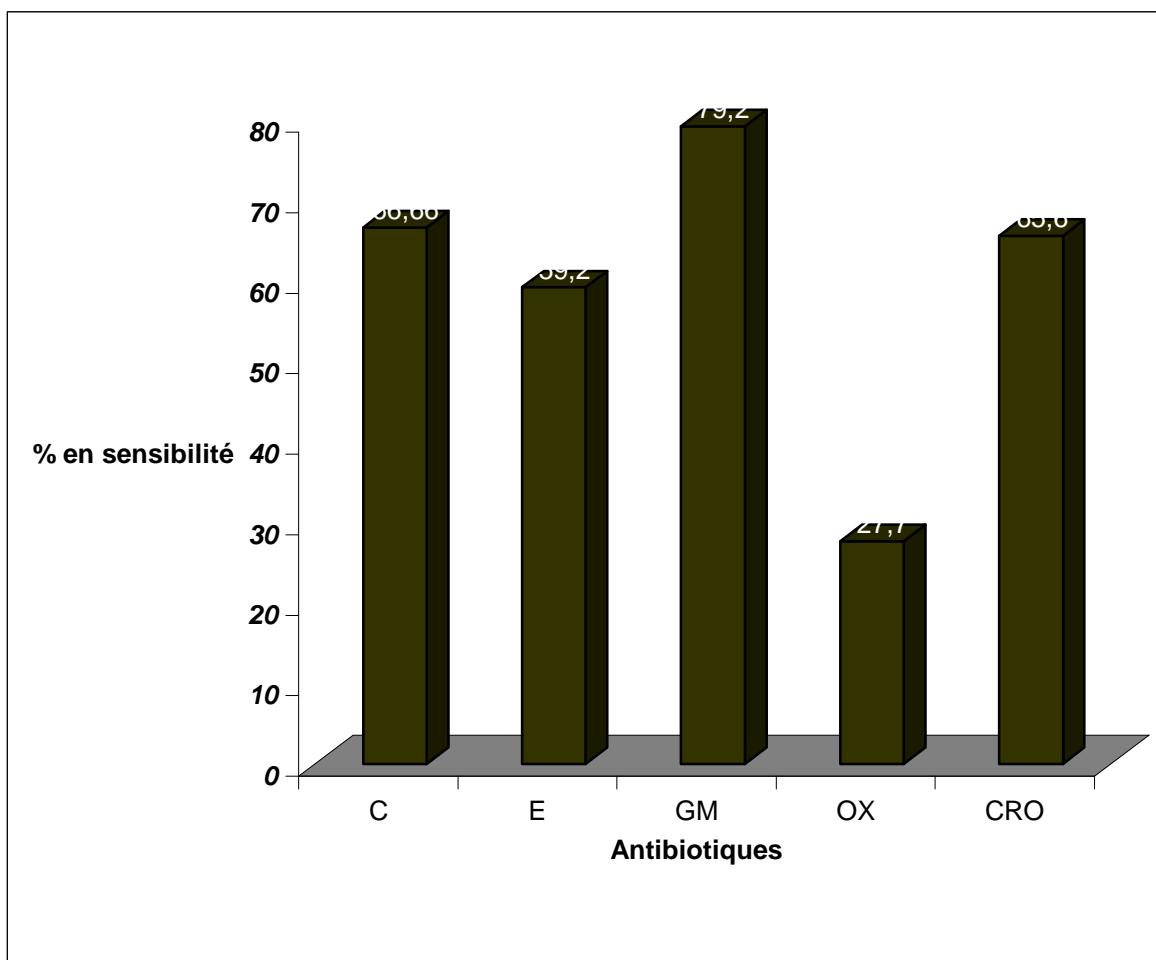


Figure 15 : Sensibilité de *Staphylococcus aureus* isolés dans le Pus

3.4.6. PV-PU

Neisseria gonorrhoeae est le germe le plus isolé. *Neisseria gonorrhoeae* est sensible 57,1% au Norfloxacine, 50% à l'amoxicilline, 75% au ceftriaxone et cefotaxime et enfin 80 % de l'association amoxicilline + acide clavulanique et tétracycline. Leur sensibilité est représentée dans la figure 16.

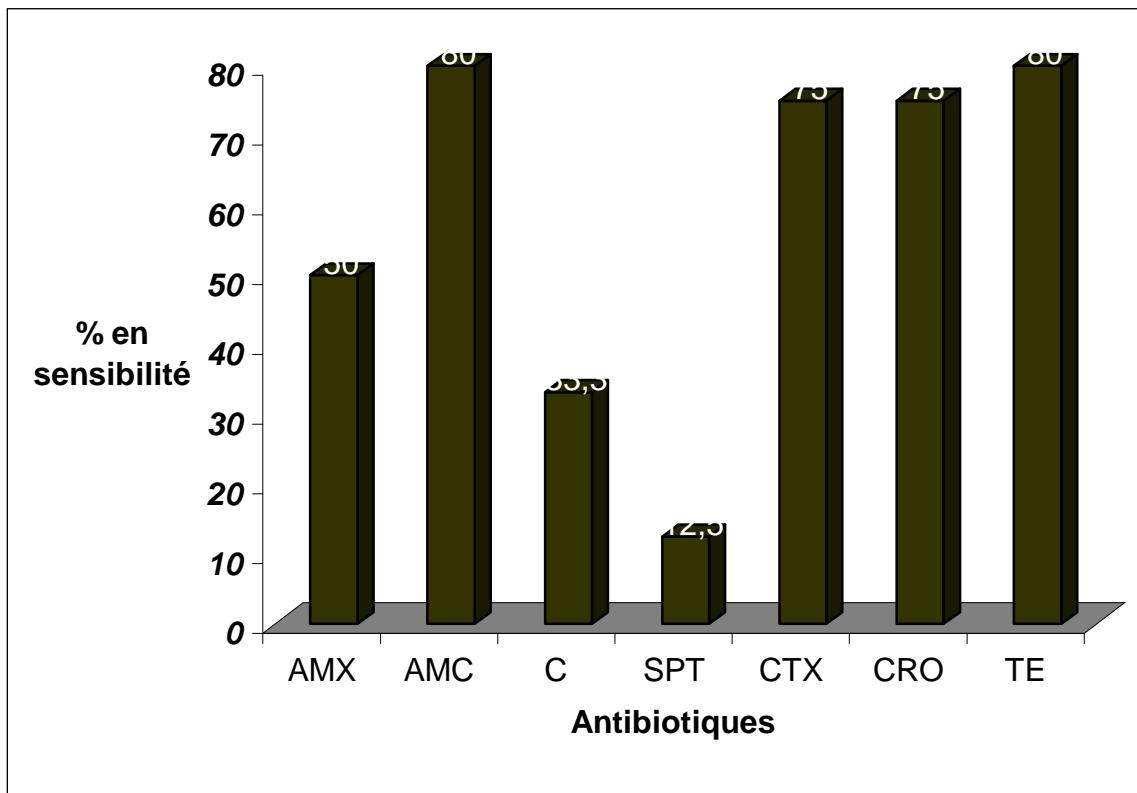


Figure 16 : Sensibilité des germes de *Neisseria gonorrhoeae* isolés dans les prélèvements génitaux

CHAPITRE IV : DISCUSSION

4.1. Résultats globaux

Durant ces cinq années (1997 – 2002), 3078 bactéries ont été isolées des différents produits pathologiques, soit un pourcentage de 26,81% du nombre total d'analyse effectué. Les entérobactéries occupent la première place avec un taux de 81,01% suivi des Cacci avec 18,99%.

4.1.1. Répartition des germes par produit pathologique

4.1.1.1. ECBU

Escherichia coli et les Klebsiella sont les germes les plus fréquents avec des taux respectifs de 45,67% et 19,78%.

Cette répartition est conforme à plusieurs études notamment celles de [16, 47].

Cependant, nous avons noté un taux faible d'*Escherichia coli* dans les urines quand nous savons que beaucoup d'études révèlent des taux supérieurs à 50% [46, 47].

Ce taux faible est certes imputable à la méthodologie de culture et d'identification des urines utilisées dans ce laboratoire : pour la culture des urines, trois milieux ont été utilisés (Cled, EMB, BEA), alors qu'un seul milieu non sélectif aurait suffit.

4.1.1.2. Coproculture

Les shigelles et les salmonelles, germes prédominants représentent respectivement 78,85% et 13,3%.

Cette répartition étant aussi conforme aux études faites à l'hôpital de FANN en 1999 par BA A. [6] et aussi en 2000-2001 par Boye A. [16].

4.1.1.3. LCR

Neisseria meningitidis est le germe le plus isolé avec un pourcentage de 44%, ce qui recoupe le résultat de 44,95% trouvé par Boye A. [16].

Les streptocoques et *Haemophilus influenzae* représentent 28,66% et 20,66%.

4.1.1.4. hémoculture

Les Klebsielles représentent 35,63%, puis les staphylocoques 22,41%. Ce sont les deux germes les plus fréquents.

4.1.1.5. Pus

Les deux germes les plus fréquents sont : les staphylocoques 34,19% et les Pseudomonas 17,17%.

4.1.1.6. Prélèvements génitaux

Neisseria gonorrhoeae est plus représenté avec 59,02% ensuite les streptocoques (24,59%). Ces taux sont très élevés par rapport aux études de [6, 16, 44]. Pour *Neisseria gonorrhoeae*, BA A. [6] trouvait 25% alors qu'avec les streptocoques, BOYE A. [16] n'avait trouvé que 3%.

4.2. Sensibilité aux antibiotiques

4.2.1. Prélèvement d'urines

➤ ***Escherichia coli* :**

C'est l'espèce le plus isolé dans les urines c'est la cause principale des infections du tractus urinaire [6, 16, 38, 42]

L'amoxicilline présente une sensibilité de 20,60%. Ce résultat est inférieur à ceux trouvés à l'hôpital de FANN par KA. R [38] avec 28%, BA. A [6] avec 30,76%, MBOUP M [40] avec 38% et DIOP D.M [28] avec 38% à l'hôpital A. Le DANTEC.

Notre résultat est encore largement en deçà des résultats trouvés par certains auteurs qui ont une sensibilité supérieure à 50% [16, 19, 54].

L'association amoxicilline + acide clavulanique nous a permis d'atteindre une sensibilité de 52,59%. Ce dernier est largement supérieur à d'autres sensibilités trouvées par NDONG K. [47] avec 38,36% à FANN et DECOUSSER J. W. [26] avec 35% à Madagascar.

En effet, cette résistance très accentuée de l'amoxicilline est liée d'une part à une production de pénicillinase, et d'autre part, à une utilisation anarchique de cette molécule dans nos structures de santé [5, 25, 34].

La résistance à l'association amoxicilline + acide clavulique serait due à la sécrétion par certaines souches d'enzymes résistants à l'acide clavulanique (Enzymes Tri) [22]

Les céphalosporines de première génération, en l'occurrence la céfaloquine a une activité de 35,54% ; cela est dû à l'existence de pénicillinase à haut niveau.

Les aminosides sont efficaces ; avec la gentamicine (86,69%) même si ce résultat est en deçà des résultats trouvés à FANN par BA. A [6] avec 95,08% ; et DIOP D. M. [29] avec 90,14%.

Les quinolones sont très actives : l'acide nalidixique est active sur 96,09% des souches. Cette haute activité des quinolones est relatée par [19]. Cela peut s'expliquer d'une part, par la rareté de prescription de ces molécules, du fait qu'ils sont onéreux, d'autre part, la résistance aux quinolones est mediée par différents gènes et non par des facteurs de résistances.

Le cotrimoxazole, quant à lui, possède une inhibition de 39,89%. Ce résultat est aussi identique à celui de [6] à 39,28%.

Les céphalosporines de 3^{ème} génération avec le ceftriaxone a donné la meilleure activité de 99,01%, ce qui n'est pas loin des résultats trouvés par d'autres auteurs [2,28,38,42,49].

Cette forte activité des céphalosporines de 3^{ème} génération est liée, aussi, à leur rareté dans les prescriptions

➤ Les Klebsielles :

La gentamicine est active à 73,9%, ce qui n'est pas loin des résultats de Maurin M[41] à 79,6%.

Les quinolones sont aussi actives : l'acide nalidixique inhibe 84% des germes.

La céfaloquine inhibe seulement 24,9% alors que le cotrimoxazole inhibe 51,5%.

4.2.2. Coproculture

➤ **Shigelles :**

L'amoxicilline n'est sensible qu'à 19,8%, l'association amoxicilline + acide clavulanique n'a permis d'améliorer la sensibilité qu'à hauteur de 41,6%.

Ces résultats sont antipodes des résultats des auteurs [6, 17, 38, 52].

Ces résultats, même s'ils ne sont pas similaires à beaucoup d'études, font ressortir une résistance des shigelles aux aminopenicillines ; ce qui est corroboré par les études de BERGER BAC [13].

La tétracycline inhibe 16,5% des germes ce qui recoupe la thèse de [15] 16,67%.

Cette sensibilité faible fait évoquer la présence de plasmides de résistances multiples.

La cotrimoxazole a une activité de 22,7% alors que le chloramphénicol inhibe 36,3% des germes.

La gentamicine possède une activité de 85,2% sur les shigelles, ce qui est égal aux résultats de BA A [6] qui a trouvé 98,6% des shigelles isolés par coproculture.

Enfin, les quinolones se sont distingués par leur puissante activité sur les shigelles.

Ainsi l'acide nalixidique est à 97,2%, la ciprofloxacine 96,77% et la norfloxacine 100%.

➤ **Salmonelles :**

L'amoxicilline et l'association amoxicilline + acide clavulanique ont des sensibilités respectives de 33,3% et 50%. Cette faible sensibilité est certes imputable d'une part à la diminution de sensibilité des salmonelles confirmé par [35]

Les céphalosporines de 3^{ème} génération avec ceftriaxone inhibent 100% des germes, ce qui reflète les travaux de MAURIN M [41] et de BEN BACHIR M à Casablanca.

Le chloramphénicol inhibe 95,6% des souches.

Les quinolones se sont révélés encore puissantes sur les Salmonelles ; ainsi nous avons une sensibilité de 96,2% pour l'acide nalidixique et 100% pour ciprofloxacine et norfloxacine. Ces résultats recoupent les travaux des auteurs [35] et [26] à Madagascar.

4.2.3. LCR

L'amoxicilline et le ceftriaxone inhibent toutes les souches de *Neisseria meningitidis*, germe le plus fréquent. Ce résultat est identique aux études du Kenya [15] et de BA A. [6].

Le chloramphénicol est efficace à 92% comme BOYE A. [16] qui avait trouvé 93,55%. La gentamicine est efficace à 75% alors que le cotrimoxazole est pratiquement inactif avec une activité de 15,4%.

4.2.4. Hémoculture

➤ ***Klebsiella pneumoniae* :**

Le chloramphénicol et la gentamicine présentent des activités de 45,45% et 20,51%.

Le cotrimoxazole inhibe 44,44% des germes. Ces résultats divergent avec ceux obtenus par DEGLA C. H. [27].

Le ceftriaxone n'a qu'une activité de 55,32%. La ciprofloxacine a donné une activité de 87,50%

➤ ***Staphylococcus aureus* :**

L'oxacilline et la gentamicine ont donné des activités respectives de 25% et 100%, ces résultats sont identiques à celui de [6].

Cette résistance de *staphylococcus aureus* est mentionnée par les études de [39] qui relate « la fréquence de la résistance à l'oxacilline » et aussi « la variété de plus en plus grande des phénotypes de résistance avec une plus fréquente sensibilité à la gentamicine ».

Le cotrimoxazole est actif à 81,25% alors que la ciprofloxacine est active à 100%. Ces résultats sont similaires à ceux de [6] mais différents des études de BA S. [7].

4.2.5. Pus

➤ ***Staphylococcus aureus* :**

L'oxacilline et l'érythromycine ont donné des activités respectives de 27,7% et 59,2% ; ce qui est très faible en comparaison des résultats de [6].

Le chloramphénicol et le ceftriaxone inhibent 66% des souches.

La gentamicine possède une activité de 79,2%, ce qui recoupe l'étude de [6]

➤ ***Pseudomonas aeruginosa* :**

Il est naturellement résistant aux aninopénicillines, aux céphalosporines de première et de deuxième génération par production d'une céphalosporinase chromogénique inductible. En effet, cette forte résistance étant relatée par DOSSO M [30] et BEN BACHIR [12].

Les céphalosporines de 3^{ème} génération en l'occurrence le ceftriaxone exerce une activité de 27,6%.

Enfin, la gentamicine donne, ici, la meilleure activité avec 56,7% de sensibilité. Ce taux moyen ne rejoint pas l'étude de BOUHADDIOUI B. [14] qui avait trouvé 93%.

4.2.6. Prélèvements Vaginaux et urétraux

Neisseria gonorrhoeae est sensible à 50% à l'amoxicilline et à 80% à l'amoxicilline + acide clavulanique.

Le chloramphénicol est actif à 33,33%, les tetracyclines inhibent 80% des germes quant aux céphalosporines de 3^{ème} génération (cefotaxime et ceftriaxone) elles possèdent une activité de 75%.

CHAPITRE V : RECOMMANDATIONS

1. Recommandations sur les matériels utilisés

Sur le choix des disques par l'antibiogramme, les techniciens devraient augmenter les disques utilisées.

Ainsi :

- Pour les Pseudomonas, il faut ajouter :
 - Ticarcilline, Piperacilline, cefotaxime, ceftriaxone, les Quinolones.
- Pour les staphylocoques, il faut ajouter :
 - Pénicilline G, ainsi que Pefloxacine
- Pour les Entérobactéries :
 - Piperacilline, Ticarcilline, Imipenème, Ceftriaxone, Cefotaxine, Gentamicine et Tobramycine

Enfin, il faudrait respecter les mentions sur les réactifs concernant les dates de péremptions.

2. Recommandations sur les méthodes

- Le laboratoire doit être doté d'un agitateur pour homogénéiser les produits pathologiques.
- Avec L'ECBU, l'ensemencement des urines totales sur trois milieux est à rectifier et n'utiliser qu'un seul milieu non sélectif (CLEd).
- Avec le LCR l'ensemencement doit être aussi fait dans les milieux suivants MH, BT, et G.S.O.

3. Recommandations sur l'utilisation des disques d'antibiotiques

Au vu des différents antibiotiques testés dans notre étude, il est de notre devoir de signaler aux médecins cliniciens ainsi qu'aux techniciens un profil de sensibilité des germes isolés dans les produits pathologiques.

- *Escherichia coli* :

Les aminosides avec la gentamicine sont efficaces ainsi que les quinolones et les céphalosporines de 3^{ème} génération.

Les aminopenicillines ne sont pas efficaces.

- Les Klebsielles :

Les aminosides sont actifs ainsi que les céphalosporines d 3^{ème} génération.

La norfloxacine est encore plus active.

- Les shigelles :

La gentamicine peut être efficace.

Les quinolones sont les plus actives ainsi que le ceftriaxone.

- Les Salmonelles :

Le chloramphénicol est très actif.

La gentamicine est aussi efficace

Les quinolones ainsi que le ceftriaxone ont une activité maximale.

- *Neisseria meningitidis* :

Le chloramphénicol est actif ; l'amoxicilline et le ceftriaxone sont très actifs.

La gentamicine est aussi active.

- *Haemophilus influenzae* :

Le chloramphénicol et le ceftriaxone sont efficaces.

La gentamicine a une activité maximale

- *Staphylococcus aureus* :

L'oxacilline est presque inactive. La gentamicine et la ciprofloxacine présentent une activité maximale.

- *Neisseria gonorrhoeae* :

L'association amoxicilline + acide clavulanique la tetracycline sont les molécules les plus efficaces.

CONCLUSION

Nous avons entrepris cette étude au niveau du laboratoire bactériologique de l'hôpital régional de Saint-Louis pour :

- effectuer une revue des activités bactériologiques sur une période de cinq ans.
- Puis apprécier les résultats obtenus (germes identifiés et leur sensibilité aux antibiotiques)

Notre étude a porté sur 3078 germes isolés, des différents produits pathologiques (Uries, Coproculture, LCR, hémoculture, Pus, prélèvements génitaux et urétraux) soit 26,81% du nombre total d'analyse faites.

Les Entérobactéries prédominent avec 81,01% ensuite suivent les Cacci avec 19,99%.

Cette étude nous a permis aussi d'avoir une Cartographie des germes et les sensibilités suivantes au niveau de chaque produit pathologique :

❖ Pour les urines :

- *Escherichia Coli* représente 45,67%, elle est sensible à la gentamicine (86,69%) et très sensible à l'acide nalidixique (91,65%).
- Les Klebsielles représentent 19,78% et ont une meilleure sensibilité avec le ceftriaxone (84,%) et la norfloxacine (91,46%). La céfaloquine et le cotrimoxazole ne sont pas actifs.

❖ Pour les Selles (Coprocultures) :

- Les Shigelles représentent 78,85%, ils sont sensibles à la gentamicine (85,52%). Le ceftriaxone et les quinolones ont des activités supérieures à 97%.
- Le Salmonelles suivent avec 13,3%, ils sont peu sensibles aux aminopenicillines mais restent sensibles au chloramphénicol (95,6%) et aux quinolones (98%).

❖ Pour le LCR :

- *Neisseria meningitidis* représente 44,95% et est résistant au cotrimoxazole, mais observe une sensibilité de 75% pour la gentamicine et 92% pour le chloramphénicol.

❖ Avec les hémocultures :

- Les Klebsielles représentent 35,63%, avec *Klebsiella pneumoniae*, seuls les quinolones ont une activité remarquable (87,56% pour la ciprofloxacine).
- Les Staphylocoques représentent 22,41%.

Avec *staphylococcus aureus*, nous avons une résistance de 75% à l'oxacilline. Cependant il présente une sensibilité de 81,25% avec le cotrimoxazole et 100% avec la ciprofloxacine.

❖ Dans le Pus :

- Les staphylocoques représentent 34,19%. *Staphylococcus aureus* présente une sensibilité de 66% au chloramphenicol et au ceftriaxone alors que la gentamicine inhibe 79,2% des souches.
- Les Pseudomonas suivent avec 17,17%.
Pseudomonas aeruginosa est résistant aux aminopenicillines, aux céphalosporines de première génération ; même avec le ceftriaxone (céphalosporine de 3^{ième} génération) il n'a été observé qu'une activité de 27,6%. Seule la gentamicine donne une sensibilité moyenne (56,7%).

❖ Avec les prélèvements génitaux :

- *Neisseria gonorrhoeae* prédomine avec 59,02%. Sa sensibilité est de 50% pour Amoxicilline et 80% pour l'association amoxicilline + acide clavulanique.
- De même la tetracycline et le ceftriaxone inhibent 80% des souches.

Enfin notre étude a permis d'avoir un aperçu global sur les activités bactériologiques d'un centre régional et en particulier le laboratoire de bactériologie de l'hôpital régional de Saint-Louis.

Les résultats obtenus confrontés à ceux trouvés par d'autres études nous ont permis de faire des recommandations et ainsi inciter les autorités compétentes à aider ces laboratoires à travailler en conformité avec les normes retenues.

BIBLIOGRAPHIE

1. AKOUA KOFFI C ; ANGNIH ; TRINITE M. et collaborateurs

Aspects Bactériologiques des méningites purulentes au CHU de Youpougon
1995-1998.

Med. Mal. Infect., 2001, 31 : 475-81.

2. AMYES S.G.B.

The Success of plasmid encoded resistance genes in clinical bacteria. An examination of plasmid mediated ampicillin and trimethoprim resistance genes and their resistance mechanisms.

J. Med. Microbiol., 1989, 28 : 73-83.

3. ANONYME

Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique.

Minibook, 1992, Paris, p. 33-45.

4. ALLOUCH P ; GHANASSIA J.C ; LE ROY M ; BENOIT M ; SIRE O.

Résistance de *pseudomonas aeruginosa* à la ciprofloxacin et à l'amikacine et sensibilité aux associations.

Sem. Hop. 1999, 65, 35 : 2205-2210.

5. AUSTIN D. J ; KAKEHSI M ; and ANDERSON M.

The transmission dynamics of antibiotic resistant bacteria :

The relationship between resistance in commensal organisms and antibiotic consumption.

Proceedings-Royal society of London biological 1997; 264 (1388) : 1629-38.

6. BA, A.

Cartographie et sensibilité des bactéries isolées au Chu de Fann.

Thèse Pharm., Dakar, 2000, N°73.

7. BA S.

Phénotype des souches de streptocoques sensibles aux aminosides.
Thèse Pharm., Dakar, 1995, N°44.

8. BARRY A. L., LANSNER R. A.

In vitro method for determining minimal lethal Concentrations for antimicrobial agent.
Am J. clin. Patho., 1979, 71, 88-92.

9. BARRY A. L., THORNS BERRY C.

Susceptibility tests: diffusion tests procedures. In: E. H lemette, A. Belows, W. J Hensler Jr. H. J seradoury (eds), Manual of clinical microbiology.
American Society for microbiology, ed., Washington, 1985, 4th ed. 978-987.

10. BAVER A. W.

The significance of bacterial inhibition zone diameters. A study of the factors in fluencing antibiotics diak sensibility tests. In: In International society of chemotherapy : proceedings of the third international congress of chemotherapy. Stuttgart Georg thiems veraly. Ed. 1964, 466-479.

11. BAUER A. W.

The two definitions of bacterial resistance. In: International society of chemotherapy, Proceedings of the third international congress of chemo therapy.
Stuttgart. Georg thiems veraly. Ed. 1964, 434-500.

12. BEN BACHIR M., BEN REDJEB S., RAHAL K., DOSSO M.

Surveillance de la sensibilité in vitro de différents pathogènes isolés des prélèvement trachéo-bronchiques, pus chirurgicaux, hémoculture, urines et d'isolats de *Neisseria gonorrhoeae*.

Médecine digest, 1995, Suppl. 4, 24-31.

13. BERGER BAC HB.

Résistance aux Bêta-lactamines.

Med., Mal. Infectieuses, 1997, 27, Numéro spécial : 195-200.

14. BERTRAN DX., THOUVEREZ., BRUAN L.

Escherichia coli : Sensibilité aux Bêta-lactamines et diversité genomique des souches isolées en France. Comté.

Med. et maladies infect. 2002, Vol 32, N°1, P8-18.

15. BOUHADDIOUI B., BEN SLAMAK., BEN AÏSSA R., BOUDABOUS A.

Caractérisation épidémiologique de *Pseudomonas aeruginosa* isolée dans l'hôpital Charles Nicolle de Tunis.

MHA : (Sousse) ; TUN., 2002, Vol. 14-39, pp. 13-18.

16. BOYE A.

Résistance bactérienne au Chu de Fann et prescription d'antibiotiques au Chu de Fann Dakar.

Thèse Med., Dakar, 2001, N°46.

17. BUISSON Y.

Résistance aux antibiotiques : épidémiologie de la résistance.

La lettre de l'infect., 1993, tome VIII, N° 16 p4.

18. BRUNO M. C.

Place des quinolones et fluoroquinolones dans le traitement des infections urinaires à la clinique urologique de l'hôpital Aristide le Dantec de Dakar.

Thèse Pharm., 1996, N°75.

19. R. CARBONE A., JARLIER V.

Entérobactéries et Bêta-lactamines

Lecture interprétative de l'antibiogramme

Paris, Roussel et Diamant, 1995, p1-16.

20. CHABBER T Y. A.

L'antibiogramme: Sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.
La Tourelle, édition., St Mandé, 1963 : 257.

21. CHABBERT Y. A.

Sensibilité bactérienne aux antibiotiques. In : L. Leminor, M. Veron.
Bactériologie médicale. Flammarion, Paris, 1982., 204-212.

**22. COHEN SP., HOOPER DC., WOLLSON J. S., SOUKA KJ., MC MURRAY
L. M., LEVYS.**

Endogenous active efflux of norfloxacin in susceptible *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agent chemother., 1988., 32: 1187-1191.

23. COOPER K.E.

The theory of antibiotic inhibition zones. In: F- kawahagh analytical micro
biology.
Academic Press. Edition., New York, 1964, 1-86.

24. COURVALIN P., PHILIPPONA.

Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents
antibactériens. In le Minor L., In Veron M., eds, Bactériologie médicale. 2^{ième}
éd, Paris, Flammarion 1989: 332-335.

25. DAVIES J.

Origins and evolution of antibiotic resistance.
Microbiologia SEM 1996., 12 (1): 9-16.

**26. DECOUSSER J. W., PFISTER P., XUERE F., RAKOTO – ALSON O.,
ROUX J. F.**

Résistance acquise aux antibiotiques à Madagascar : Première évolution.
Med. Trop., 1999, 59, p. 259-265.

27. DEGLA C. H.

Contribution du laboratoire de bactériologie à l'étude des shigelles. Bilan sur 11 années (1981-1991) au Chu Fann.

Thèse Pharm., Dakar, 1992, N° 31.

28. DIAW EI. M.

Etude de la sensibilité aux antibiotiques par E-test de souches de Coccis isolées au Chu Le Dantec.

Thèse Pharm., Dakar, 1999, N° 76.

29. DIOP D. M.

Etude de la sensibilité par E. test de souches de bacilles à Gram négatif isolé au Chu de Dakar.

Thèse Pharm., Dakar, 1998, N° 69.

30. Dosso M.

Etude de la sensibilité in vitro aux antibiotiques de différents isolats bactériens à Abidjan : résultats à propos de 90 souches.

Médecine digest, 1995 suppl., 4, 32-38.

31. FALL N. M. F.

Etude de l'effet inoculum sur la variation de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Thèse pharm., Dakar, 1995, N°17.

32. FAYE I.

Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches bactériennes isolées à Dakar: intérêt de l'utilisation de la technique E-test et du programme WHONET.

Thèse Pharm., Dakar, 1997, N° 7.

33. FERRON A.

Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine.
Paris, édition C. et R., 1984, 12^{ème} édition, p. 347-359.

34. GALLERI C. M. et al.

Les résistances bactériennes en relation avec la consommation d'antibiotiques.
Igiène Moderna 1982, 77 (3) : 389-432.

35. GARRAGE E., SOULLIE B., CAVALLO J. D.

Sensibilité aux antibiotiques des Salmonelles isolées dans les hôpitaux des armées en 1998-1999.

La Presse médicale 2002 ; 31 (17) : 787-793.

36. HOOPER DC., WOLLSOON JS., SOUKA., KS., MC MUGH GI., SWARZ M.

Mechanisms of quinolones resistance in *Escherichia coli* Characterization, two mutants resistance loci decreasing norfloxacin accumulation.

Antimicrob chemother., 1989, 33 : 283-290.

37. JOFFIN J-N., LEYRAL G.

Antibiogramme : méthode des disques. In : Microbiologie technique, tome I, Dictionnaire de Technique Bordeaux, centre régional de documentation pédagogique, 1991, 14-25.

38. KA R.

Résistance bactérienne au Chu de Fann : Etat de leurs prescriptions.
Thèse Med., Dakar, 2001, N° 8.

39. LECLERCQ R.

Résistance des staphylocoques aux antibiotiques.
Annales françaises d'anesthésie et de réanimation, 2002 ; 21 (5) : 375-383.

40. MALOUN F., BRYAN L. E.

Modification of penicillin binding proteins as mechanisms of bêta-lactam résistance.

Antimicrob. Agents chemother, 1986, 30 : 1-5.

41. MAURIN M., MUSSOD., CHARREL E., et coll.

Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (Bacilles à gram négatif aérobies) situation 1992 à Marseille.

Med., Mal. Infect. ; 1995, 25 : 508-14.

42. MBOUP E. M.

Sensibilité des bacilles à Gram négatif au Chu Fann Dakar.

Thèse Pharm. Dakar, 1996, N° 75. 41.

43. MODAI J.

Cephalosporines orales : nouveautés et place en thérapeutique.

Revue du praticien, 1993, 43 (2) : 195-9.

44. MONLTTE D.

Phénotype de résistance des bactéries aux antibiotiques.

La rubrique de l'interne. Option biologie, 1994, 3, p. 5.

45. MOULIN M.

Pharmacologie

Paris : Masson, 1998, pp. 6-9, 115.

46. NDIAYE Y. K.

Evaluation de sensibilité aux antibiotiques et de la résistance par sécrétion de bêta-lactamines à spectre élargi des souches de bacilles à Gram négatif isolée au Chu de Dakar.

Thèse Pharm. Dakar, 1992, N° 95.

47. NDONG K.

Etude de la résistance bactérienne selon le produit pathologique au Chu de Fann (2000-2001) thèse Pharm., Dakar, 2002, N° 92.

48. PEANY.

Surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Press. Med., 200,29 : 2069-2071.

49. PINCHON T. M., EMERIQUE P., et DEMAN C.

Consommation d'antibiotiques et profils de sensibilité de quelques micro-organismes dans un centre hospitalier général.

Med., Mal. Infct., 1987, 3: 124-7.

50. SCAVIZZI M.

Antibiotherapie "adaptée" contre antibiotherapie "à l'aveugle".

Med. Digest, 1975, 3, 2055-2066.

51. SINGLETON P., SAIN S BURY D.

Abrégé de Bactériologie.

Paris, Masson, 1984, 4, 258 p.

52. SOW O.

Place et résistance des souches épidémiques de *shigella dysenteriae* isolées au Chu de Fann entre 1995 et 1999.

Thèse Pharm., Dakar, 2000, N° 84.

53. STRERS E., FOLTZ E. L., GRAVES B., RIDEN J.

An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics.

Antibiot chemother, 1989, 307-311.

54. Vu. THIEN H.

Antibiotic sensitivity to isolated bacteria in pédiatric urinary infection.

Arch pediatr, 1998, 5 suppl. 32665-2685.