



\*\*\*\*\*

Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie

Année Universitaire 2008- 2009

Thèse N° /P

**ETUDE DES CONTAMINANTS DES HEMOCULTURES AU  
LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE DU CVD DU CHU GABRIEL  
TOURE DE 2002 A 2006.**

***THESE***

Présentée et soutenue publiquement le \_\_/\_\_/ 2008

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

Par Mr Mahamadou Ousmane

Pour obtenir le Grade de

Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

**JURY**

Président : Professeur Ibrahim I Maïga

Membre : Docteur Broulaye Traoré

Codirecteur de thèse : Docteur Souleymane Diallo

Directeur de thèse : Professeur Flabou Bougoudogo

## DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

### ❖ **A DIEU**

LE tout puissant, le miséricordieux, de m’ avoir donné la santé et le courage de venir au bout de ce travail. Que sa bénédiction et sa protection soient sur tous.

Amen !

A son PROPHETE MOHAMED paix et salut sur Lui.

### ❖ **A mon père Bazi Baba Maïga**

Tu nous as toujours guidé nos pas vers la réussite. Ta rigueur dans l’éducation, ta sagesse, tes critiques et ta culture d’une famille unie resteront à jamais dans nos mémoires. Q’ALLAH Le Tout Puisant puisse te garde encore longtemps auprès de nous pour que tu puisses profiter des fruits de nos efforts. Trouve à ce modeste travail un début de récompense de tes nombreux sacrifices.

### ❖ **A mon père Ousmane Babakodda.**

Tu es pour moi l’exemple inégalable de la rigueur, de la patience et de la justice. Que Dieu te garde pendant longtemps à nos cotés et qu’il exhausse tes bénédictions.

### ❖ **A ma mère Zeïnaba Maïga**

Pour votre amour, vos encouragements constants ainsi que vos 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 ma tante Halimata F Maïga**

Merci pour tout.

❖ **REMERCIEMENTS**

Je remercie le bon DIEU de m'avoir donné la force, le courage et la santé de venir à bout de ce travail. Que la paix soit sur son Prophète MOHAMED paix et salut sur lui.

❖ **Mes parents**

Je ne cesserai jamais de vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour nous.

❖ **A mes frères et soeurs**

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

❖ **A mes grand- parents**

Que la paix soit sur vous. Q'ALLAH Le Tout puissant vous accorde la paix perpétuelle. Amen !

❖ **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"**

❖ **A mes amis les plus chers**

Comme on a l'habitude de le dire « C'est dans les moments difficiles qu'on reconnaît ses vrais amis». Sachez qu'en aucun moment je n'ai regretté votre compagnie. Merci pour votre affection et pour votre sincère fidélité.

❖ **AUX DOCTEURS**

Samba A Sangaré, Ténin Samaké, Mariam Samaké, Aliou Touré, Cheick FM Diabaté, Modibo Sadessi, Alphady A Cissé, Makandjan Dembéle.

❖ **A mon frère et ami Samuel Adolphe Omar.**

In Memorium

❖ **A vous les enfants malades du monde**

Que Dieu vous donne la santé

❖ **A vous tous mes camarades de service**

Boubacar, Aziz, Zekra, Corneille, Malla, Mä, Niané, merci pour tous.

❖ **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 Professeur 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'Odonto Stomatologie, plus précisément à la promotion 2005.
- ❖ 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.

## HOMMAGE AUX MEMBRES DE JURY

❖ A notre Maître et Président de jury

**Professeur Ibrahim I Maïga**

**Professeur agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**

**Chef de service du laboratoire de l'Hôpital National du point G**

Cher maître c'est avec 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 Broulaye Traoré**

**Médecin Spécialité en pédiatrie,**

**Chef de service de la pédiatrie de l'Hôpital Gabriel TOURE,**

**Président de L'AMALDEME,**

**Chargé de cours dans les écoles de formation Sanitaires.**

Cher Maître, malgré vos multiples occupations, vous avez accepté de juger ce travail.

Homme aux qualités scientifiques importantes, nous avons été séduits par la simplicité, la clarté et la rigueur de vos enseignements.

En plus de vos connaissances scientifiques, votre sens social de la vie vous force le respect.



❖ A notre Maître et co- Directeur de thèse

**Docteur Souleymane DIALLO**

**Pharmacien Biologiste des Services de Santé des Armées.**

**Maître assistant de Bactériologie- Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**

**Chef de service du laboratoire d'Analyses Médicales de l'Hôpital Gabriel TOURE**

Cher Maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous avez placée en nous pour effectuer ce travail. Les mots me manquent pour vous exprimer combien cela fut un plaisir de travailler avec vous. Je peux d'ailleurs affirmer que j'ai fait mes premières initiations dans le monde de la microbiologie à vos côtés. Votre simplicité, votre compétence et surtout votre rigueur scientifique sont des atouts qui nous ont fasciné et dont nous avons bénéficié tout au long de notre formation. Vous n'avez ménagé aucun effort pour la belle réalisation de ce travail qui, également, est le vôtre.

Cher Maître, trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères reconnaissances.

❖ A notre Maître et Directeur de thèse

**Professeur Flabou BOUGOUDOGO**

**Maître de conférence agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie**

**Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique**

**Responsable des cours de bactériologie et virologie à la FMPOS, Chevalier de l'ordre du mérite de la Santé.**

Cher Maître, vous nous avez fait honneur en acceptant la réalisation de cette thèse dans le service de laboratoire d'Analyses Médicales **de l'Hôpital Gabriel TOURE**. En plus de votre statut de chercheur confirmé et aguerri, **nous avons vite apprécié** vos immenses qualités humaines et scientifiques. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître respecté et admiré de tous.

Soyez assuré, cher maître, de notre sincère admiration et de notre profonde gratitude. Nous vous réitérons tous nos remerciements.

## ABREVIATIONS ET SIGLES

BD: Becton Dickinson

BGN: Bacille Gram Négatif

BGP: Bacille Gram Positif

CNHUMC : Centre National de l' Hôpital Ubert maga de Cotonou

CVD : « Center for Vaccine Development » = Centre pour les Vaccins en Développement

CGPpr : Cocci Gram Positif en paire

CGPch : Cocci Gram Positif en chaîne

CoccoBGN : Cocco Bacille Gram Négatif

CRO- 30 : Céftriaxone 30 $\mu$ g

DCGN : Diplocoque Gram Négatif

Fab : Fragment antigens binding (fragment de transport des antigènes)

Fc : Fragment constant

GC% : Guanine- Cytosine pour cent

HGT : Hôpital Gabriel TOURE

HNPT : Hôpital National du point G

IgG : Immunoglobuline G

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

LCR : Liquide Céphalo- Rachidien

Méti- R : Méricilline Résistante

Méti- S : Méricilline Sensible

OXA-5 : Oxacilline 5 $\mu$ g

pH : Potentiel d'Hydrogène

P-10 : Pénicilline G 10 $\mu$ g

SNA : Staphylococcus non aureus

SIBI : Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive

SNC : Staphylocoque à Coagulase Négative.

PLAN

1. INTRODUCTION.....	1
Objectif général	
Objectifs spécifiques	
2. GENERALITES SUR LES PRINCIPAUX MICROORGANISMES A L'ORIGINE DE CONTAMINATION.....	3
3. METHODOLOGIE.....	18
4. RESULTATS.....	37
5. COMMENTAIRE ET DISCUSSIONS.....	55
6. CONCLUSION.....	60
7. REFERENCES.....	61
8. RESUME.....	64

## SOMMAIRES

1. INTRODUCTION.....	1
2. GENERALITES.....	3
2.1. Rappels sur l'hémoculture.....	3
2.1.1. Définition.....	3
2.1.2. Objectifs et indications de l'hémoculture.....	3
2.1.3. Réalisation de l'hémoculture.....	3
2.1.3.1. Prélèvement sanguin.....	3
2.1.3.1.1. Moment du prélèvement.....	3
2.1.3.1.2. Volume sanguin.....	4
2.1.3.1.3. Technique de prélèvement.....	4
2.1.3.1.4. Mode de prélèvement.....	4
2.1.3.1.5. Milieux pour hémoculture.....	7
2.1.3.1.6. Flacons d'hémoculture.....	7
2.1.4. Détection automatisée.....	11
2.1.5. Résultats –Interprétation.....	12
2.2. Principaux micro- organismes à l'origine de Contaminations.....	14
2.2.1.1. Parmi les Staphylocoques.....	14

2.2.1.2. Parmi les Bacilles à Gram Positif.....	15
2.2.1.3. Parmi les levures.....	17
3. Méthodologie.....	18
3. 1.Cadre d'étude.....	18
3.2. Type d'étude.....	19
3.3. Durée de l'étude.....	20
3.4. Critères d'inclusion et de non – inclusion.....	20
3.4.1. Critères d'inclusion.....	20
3.4.2. Critères de non –inclusion.....	20
3.5. Présentation de la méthode.....	20
3.6. Protocole de Technique des hémocultures positives.....	21
3.7. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	27
3.7.1. Coloration de Gram.....	27
3.7. 2. Tests biochimiques et métaboliques.....	30
3.8. Conservation des souches.....	33
3.9. Contrôle de la qualité des réactifs et milieux de cultures.....	35
4. Résultats.....	37
5. Commentaires et discussions.....	55

6. Conclusion.....	60
7. Références.....	61
8. Résumé.....	64

## 1. INTRODUCTION

Les bactériémies, sont une préoccupation permanente pour le clinicien exerçant en milieu hospitalier. La découverte de la porte d'entrée des bactéries dans l'organisme, la multiplicité des bactéries rencontrées en infectiologie humaine, l'itinéraire thérapeutique des patients, sont des facteurs aggravants les états bactériémiques en Afrique au sud du sahara ; la conséquence immédiate de ces différentes contraintes est la mise en œuvre tardive d'un traitement approprié. La létalité des chocs toximiques estimée à 40% justifie l'urgence de la prise en charge de ces infections [1]

La recherche de la bactérie responsable de la bactériémie est le rôle imparti au microbiologiste dans le protocole de diagnostic de l'état bactériémique.

La découverte du germe pathogène confirme l'infection. Le germe retrouvé dans les prélèvements (hémoculture, Liquide Céphalo- Rachidien...) est-il le germe pathogène ou un germe de l'environnement du malade, du site de prélèvement ou des conditions de travail du laboratoire ?

L'Hémoculture et le Liquide Céphalo- Rachidien (LCR) représentent les examens de choix pour le diagnostic étiologique de tout état bactériémique. Leur réalisation suit un protocole bien codifié, impose souvent des délais de résultats inappropriés à l'urgence médicale que représentent les bactériémies. De plus, l'hémoculture et les LCR demeurent des examens peu demandés par les cliniciens du fait de la qualité du plateau technique, de leur fiabilité et de leur coût élevé [13]

Cependant leur exécution correcte permet d'établir le rôle du germe pathogène de celui du germe à l'origine de contamination.



Du fait de la gravité des états bactériémiques, la collaboration étroite entre le clinicien et le microbiologiste s'avère donc une nécessité pour une meilleure prise en charge des états bactériémiques. Nous nous sommes donc intéressés à l'identification des micro-organismes à l'origine de contamination dans l'exécution des hémocultures.

Pour y parvenir nous nous sommes fixés les objectifs suivants

#### Objectif général

Etudier les contaminants des hémocultures effectuées au laboratoire de bactériologie CVD du CHU de Gabriel TOURE

#### Objectifs spécifiques

- Déterminer la fréquence des prélèvements d'hémoculture ;
- Identifier les germes isolés des hémocultures
- Identifier les contaminants des hémocultures.
- Etablir et suivre les taux de contaminations des hémocultures.

## 2. GENERALITES

### 2.1. Rappels sur l'hémoculture :

#### 2.1.1. Définition :

Le terme «hémoculture» peut revêtir deux aspects selon le contexte d'utilisation. En règle générale, l'hémoculture est la technique microbiologique visant à déceler et à identifier des bactéries ou autres microorganismes cultivables sur des milieux appropriés, à partir de prélèvements sanguins.

#### 2.1.2. Objectifs et indications :

L'hémoculture aura deux objectifs :

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

- Un objectif thérapeutique : l'isolement et l'identification de la bactérie cliniquement significative, seront complétés par une étude de sa sensibilité à diverses substances antibactériennes pour un ajustement de l'antibiothérapie probabiliste préalablement instaurée par le clinicien, après ou avant le prélèvement sanguin, en fonction du tableau clinique du patient[30]

#### 2.1.3. Réalisation de l'hémoculture :

Différents facteurs influent sur la positivité d'une hémoculture.

##### 2.1.3.1. Prélèvement sanguin

###### 2.1.3.1.1. Moment du prélèvement

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

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

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

#### 2.1.3.1.2. Volume sanguin

Le nombre de bactéries par ml de sang étant en général faible, il importe de prélever une quantité suffisante de sang.

- Pour l'adulte, 10ml par ponction veineuse périphérique. La veine du pli du coude est la plus indiquée.
- Chez l'enfant ou le nouveau-né, le volume de sang à prélever doit être déterminé par le médecin traitant. Pour le nouveau-né, il est souvent difficile d'obtenir plus d'1 à 2ml de sang. Chez l'enfant 2 à 5ml de sang peuvent suffire.

#### 2.1.3.1.3. Technique de prélèvement

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

L'interprétation des résultats devient alors problématique.

#### 2.1.3.1.4. Mode de prélèvement

Les modes de prélèvement sont variables.

- Des systèmes de prélèvement proposés dans le commerce sont largement utilisés de nos jours. Le système est constitué d'une tubulure munie à chaque extrémité d'une aiguille permettant l'une la ponction veineuse, l'autre l'inoculation des flacons.
- D'autres utilisateurs emploient simplement une seringue stérile montée avec laquelle ilsensemencent les flacons au lit du malade.

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

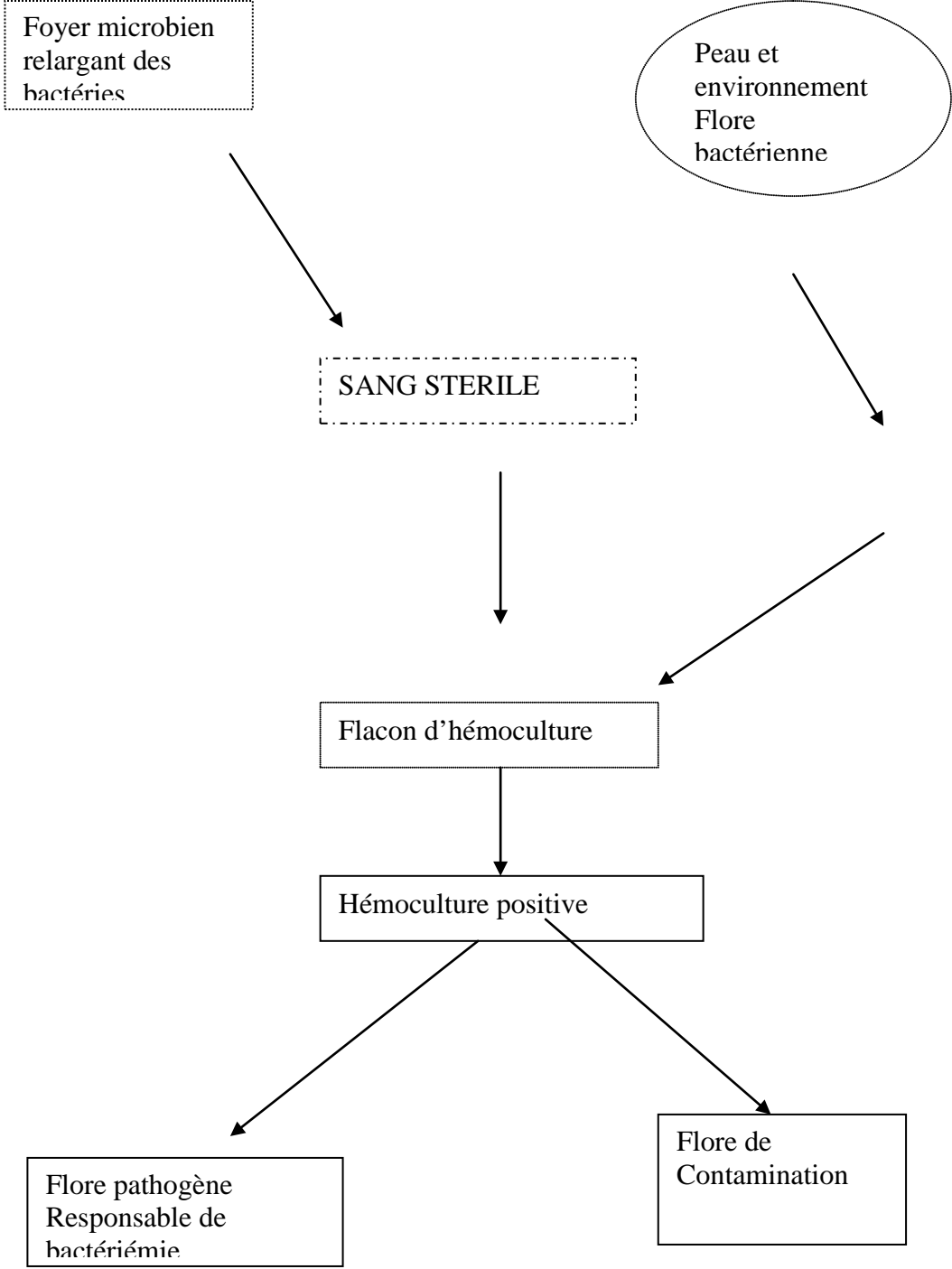


Figure 1 : Agents bactériens attendus

#### 2.1.3.1.5. Milieux d'hémoculture

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

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

#### 2.1.3.1.6. Flacons d'hémoculture

##### - Constitution des flacons

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

##### - Typologie des flacons

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

##### - Flacons aérobies

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

##### - Flacons anaérobies

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

##### - Flacons spéciaux

D'autres types de flacons sont proposés en fonction de la clinique du patient par les fabricants.

##### - Etude spécifique des flacons BACTEC®

L'utilisation de résines dans les milieux d'hémoculture est un des éléments qui permet de répondre aux attentes des laboratoires de microbiologie. Des milieux d'hémoculture à base de résines pour BACTEC<sup>®</sup> sont fabriqués depuis 1983. Le fait que les résines restent dans le milieu liquide pendant toute la période d'incubation et de culture est l'une des caractéristiques distinctives de ces produits. Comme les résines font partie de l'environnement de l'hémoculture, elles peuvent exercer leurs effets pendant toute la phase de croissance des microorganismes.

En 1988, des résines ont été ajoutées dans un flacon prévu pour un grand volume de sang, le BACTEC<sup>®</sup> Plus. Des études ont démontré qu'on obtenait une forte augmentation du nombre de germes mis en évidence et une réduction nette du temps de détection par rapport aux milieux ne contenant pas de résines. Une augmentation pouvant aller jusqu'à 30% de positifs a été constatée [31]

Les résines absorbent et neutralisent les antibiotiques, mais en plus, elles semblent favoriser la croissance et la mise en évidence des germes par l'intermédiaire d'autres mécanismes.

Les résines sont des billes sphériques extrêmement poreuses de polydivinylbenzène. Dans certaines industries, on les utilise en chromatographie pour séparer les molécules et pour extraire une large gamme de molécules en solution. L'étendue des capacités d'absorption des résines est à la variété des facteurs impliqués tels que la surface, la taille des pores et la polarité de la surface. L'élément de base d'une bille de résine est une microsphère. D'un diamètre de 80 à 100 angströms, les microsphères se combinent pour former un amas sphérique. Les billes de résines des flacons d'hémoculture BACTEC<sup>®</sup> ont un diamètre d'environ 500 microns. Il y a deux types de résines dans les flacons BACTEC<sup>®</sup>. Les billes de résines de couleur claire sont hydrophobes, alors que les billes de résines foncées sont hydrophiles et chargées électriquement. Elles sont conçues pour absorber différents types d'antibiotiques.

. Mécanismes d'actions des résines BACTEC<sup>®</sup>

Au niveau moléculaire, les billes de résines de différentes couleurs ont des structures très semblables. Les résines claires, de nature chimique hydrophobe, attirent les composants hydrophobes des antibiotiques sur leur surface. En fait, les antibiotiques qui ont des doubles liaisons conjuguées se fixent sur les résines et partagent des électrons avec celles-ci.

De leur côté, les résines foncées de nature chimique hydrophile, attirent les composants cationiques hydrophiles des antibiotiques. Ces résines utilisent les résidus d'acide sulfonique. Elles forment des liaisons ioniques avec des antibiotiques. La surface des billes, ou l'espace disponible pour les liaisons, est une des qualités les plus importantes des résines BACTEC<sup>®</sup>. Chaque flacon BACTEC<sup>®</sup> Plus contient 5 grammes de résines. Ces 5 grammes de résines ont la même surface que 5 terrains de football. On a émis la théorie que cette surface supplémentaire créait des microenvironnements favorisant la croissance de certains germes.

Grâce à la microscopie électronique, on peut obtenir une vision rapprochée de résines. Avec un grossissement de 30000 fois. A ce grossissement, la surface semble lisse.

Un examen plus rapproché nous révèle que certaines zones de la surface de la bille présentent des crevasses et des cavités. A un grossissement de 50000 fois, ces cavités commencent à ressembler à des canyons avec des failles de 700 à 900 nanomètres. Les antibiotiques peuvent facilement passer dans ces failles et se fixer sur les sites moléculaires des surfaces intérieures des résines.

Les molécules d'ampicilline présentes dans l'échantillon d'hémoculture après ensemencement entrent en contact avec les résines. D'autres antibiotiques auraient un comportement similaire. La forte attraction des antibiotiques pour les liaisons pi de la structure des résines entraîne la formation d'une liaison, ce qui neutralise la capacité inhibitrice de la drogue vis-à-vis de la croissance du germe.



Le côté gras ou hydrophobe de l'antibiotique a une affinité pour les orbitaux de pi au niveau des doubles liaisons de la structure polymère globale de la résine. Une fois que la liaison moléculaire est créée entre la résine et l'antibiotique, l'effet de la drogue est neutralisé.

Il y a des dizaines de milliers de sites de fixation pour l'antibiotique sur chacune des billes de résine et près de 10000 billes dans chaque flacon d'hémoculture BACTEC®.

La communauté des microbiologistes reconnaît la valeur des résines pour la neutralisation des antibiotiques. Mais le fait que la résine BACTEC® reste à l'intérieur du flacon d'hémoculture présente d'autres avantages pour la mise en évidence des microorganismes.

Selon le Dr. KOONTZ du Centre médical de l'université d'Iowa : "Non seulement les résines détruisent les cellules de façon mécanique grâce à l'agitation, mais elles détruisent également des amas cellulaires, ce qui accélère leur division. Elles offrent une surface sur laquelle les bactéries peuvent se fixer. Les résines absorbent également les éléments nutritifs. Il vous suffit de comparer un flacon à résines à un flacon n'en contenant pas. Le flacon contenant des résines est transparent comme de l'eau distillée, l'autre est jaune comme de l'urine. Les nutriments sont fixés sur les résines. On peut donc comparer la résine à une table d'hôte, à un lit pliant et à un mur de protection contre les antibiotiques. Elles disloquent les cellules, absorbent les antibiotiques et sert de support sur lequel les bactéries peuvent se fixer et se multiplier. Les bactéries se reproduisent toujours mieux quand on les fait pousser sur un support.

Des recherches et des études plus approfondies ont produit ces micrographies électroniques très intéressantes d'amas de staphylocoques et de streptocoques sur une bille de résines BACTEC®. Ces micrographies donnent une meilleure idée de l'échelle. Les billes de résine sont en général 100 à 200 fois plus grosses que la plupart des bactéries.

Selon le Dr. Donald Jungking du Thomas Jefferson University

Hospital : "L'inhibition des antibiotiques est un phénomène bien connu. Le second phénomène mis en évidence concerne l'éclatement mécanique des globules blancs et le fait que les globules blancs sont physiquement brisés. Si on augmente la vitesse d'agitation, ce phénomène s'accélère, et on obtient une plus grande scission des globules blancs.

Il se produit un broyage des globules blancs lorsqu'ils sont pris entre des billes de résines qui sont secouées par l'agitateur, entraînant ainsi la rupture des globules blancs".

Les études "Indian 111" nous ont révélé que les particules de résines contenues dans les hémocultures agissaient selon un second mode d'action entraînant l'éclatement mécanique des cellules. Le degré de lyse des globules blancs et la rapidité avec laquelle ils sont lysés, ont une influence directe sur la mise en évidence des bactéries. Plus la lyse est rapide, plus elle est complète, mieux on détecte les bactéries dans une hémoculture.

Les milieux résines correspondent à un progrès technologique très innovateur. Ils permettent un recouvrement optimal des microorganismes à partir des hémocultures et une diminution significative du temps de détection. [4]

#### 2.1.4. Détection automatisée

Divers automates (Bactec 9050, Bactec 9240 de chez Becton Dickinson and Company, Bio Argos chez Organon Technica, Bact Alert chez bio- Mérieux,) permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives par la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance bactérienne.

Ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats.

Leur seul inconvénient est le coût onéreux.

Différents systèmes plus sophistiqués sont proposés mais ils n'ont pas fait la preuve évidente d'une supériorité pour la détection de positivité des hémocultures.

#### 2.1.5. Résultats –Interprétation

Les résultats d'une hémoculture peuvent revêtir deux aspects :

#### 2.1.5.1. Résultats normaux

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

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

#### 2.1.5.2. Résultats pathologiques

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

Schématiquement, on peut distinguer trois types de résultats :

##### - Premier cas

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

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

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

##### - Deuxième cas

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

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

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

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

- Troisième cas

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

Cependant, plusieurs hémocultures peuvent être négatives malgré une clinique évocatrice. Plusieurs causes d'échec peuvent expliquer l'obtention de faux négatifs : prélèvement effectué au mauvais moment ou tardivement, prélèvement fait sous antibiothérapie, quantité insuffisante de sangensemencé, milieux ou conditions de culture inappropriés, temps d'observation trop court, mauvaise observation des flacons, mauvais choix des conditions de subcultures.

Pratiquée avant toute antibiothérapie, et suivant un protocole rigoureux devant maintenir continuellement une aseptie totale, l'hémoculture constitue l'élément capital du diagnostic d'une bactériémie physiologique ou pathologique. Les résultats de l'hémoculture en cas de positivité doivent cependant être complétés par l'étude de l'activité des substances antibactériennes en vue d'une antibiothérapie en rapport avec la clinique du patient. La confrontation entre les

résultats en laboratoire et la clinique s'avère donc indispensable à toutes les étapes du diagnostic.

Il est parfois difficile de distinguer une hémoculture positive d'une souillure, notamment en cas de staphylocoque. Exiger plusieurs prélèvements positifs.

Une hémoculture négative ne permet pas d'éliminer une septicémie car les causes d'échec sont nombreuses : traitement antibiotique préalable, ensemencement par une quantité de sang inadéquate, choix d'un milieu de culture inadapté, faible concentration des germes dans le sang circulant.

[9]

## 2.2. Principaux micro-organismes à l'origine de contaminations

### 2.2.1.1. Parmi les Staphylocoques

#### - Staphylocoques à coagulase- négatives

La majorité des staphylocoques à coagulase négative (SCN) sont des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales. Trois facteurs favorisent ces infections : l'immunodépression, la présence de cathéters veineux ou de matériaux prothétiques, la multi résistance des SCN aux antibiotiques. *Staphylococcus epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier. [11]

*Staphylococcus epidermidis* peut provoquer des infections chez les sujets porteurs de matériel étranger (cathéter intra- vasculaires, prothèses ostéo-articulaires, boîtiers de stimulation cardiaque, valves de dérivation du liquide céphalo-rachidien...). La production d'exopolysaccharides augmente sa capacité d'adhésion aux biomatériaux et va empêcher la pénétration des antibiotiques, rendant leur éradication difficile. *Staphylococcus epidermidis* est aussi responsable de septicémies notamment dans les services d'oncologie et de néonatalogie, de péritonites chez les patients en dialyse péritonéale, d'endocardites surtout chez les sujets porteurs de prothèse valvulaire cardiaque, d'infections sur valve de dérivation du liquide céphalo-rachidien. Plus rarement, cette espèce est responsable d'infections sur prothèse orthopédique, de cystites

et de pyélonéphrites.

***Staphylococcus haemolyticus*** est la seconde espèce responsable d'infections humaines, en particulier de suppurations, d'infections urinaires et de septicémies.

Au sein des SCN, deux espèces sont responsables d'infections communautaires : ***Staphylococcus saprophyticus*** par ses capacités à adhérer à l'épithélium vésical provoque des cystites chez les jeunes femmes et ***Staphylococcus lugdunensis*** est responsable d'infections cutanées et d'endocardites infectieuses [10]

#### 2.2.1.1.2. Parmi les Bacilles Gram Positif :

Les Corynébactéries non- pathogènes, hôtes normaux de la peau et des muqueuses et pouvant, à ce titre, être confondues avec le bacille de la diphtérie ; elles sont appelées Corynébactéries«diphthéroïdes» ou pseudo- diphtérique ; qui feront l'objet de notre étude.

- Corynébactéries pseudo- diphtériques :

Pendant le demi-siècle qui a suivi la description par HOFMANN d'une Corynébactérie non pathogène, ***Corynebacterium hofmanni***, puis par NICOLLE de ***Corynebacterium cutis*** commune, la plupart des livres de bactériologie se limitent à la description de ces deux espèces. On sait aujourd'hui qu'il y a au moins 15 espèces de bacilles diphtéroïdes.

[2]

#### 2.2.1.1.3. Parmi les levures

Les champignons sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Les facteurs de prédisposition des patients concernés sont : l'immunodépression, l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, de cathéters veineux centraux, en particulier pour l'administration de solutions d'hyperalimentation. Les résultats récents indiquent que la détection des fongémies constituent un des examens- clés du diagnostic des mycoses invasives, comme les candidoses.

Bien qu'il existe peu d'études incluant un nombre suffisant d'isolats fongiques permettant de l'affirmer, il y a toutes les raisons de penser que les facteurs critiques influençant la détection des bactériémies, jouent également un rôle décisif pour la mise en évidence des fongémies. Ainsi, la répétition des prélèvements, le volume de sang mis en culture par rapport au volume de milieu, la formulation du milieu et les conditions d'incubation (aération, température et durée) sont des facteurs influençant l'efficacité des hémocultures. La température optimale de culture varie de 27°C à 30°C pour les champignons filamenteux, à 37°C pour les levures. De même, la durée d'incubation est variable, de 2 à 3 jours pour la plupart des levures, de 3 à 6 semaines pour les champignons dimorphiques.

A noter que parmi les levures, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata* et *Candida krusei* demandent généralement une incubation plus prolongée pour être détectés que *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ou *Candida parapsilosis*. Néanmoins, malgré l'optimisation de ces variables dans les meilleures méthodes d'hémoculture actuellement en usage, ces dernières restent encore trop souvent négatives dans les infections fongiques disséminées. Les milieux biphasiques sont classiquement considérés comme les meilleurs pour la croissance des champignons. Le milieu "Brain Heart Infusion" (BHI) apparaît comme le meilleur pour la détection des levures. Le développement des automates a constitué un progrès par rapport aux procédés traditionnels de détection des fongémies. Mais c'est aussi l'adaptation des milieux à la croissance fongique qui a considérablement amélioré la rapidité de détection des fongémies et la fréquence d'isolement des champignons (tout particulièrement des levures) dans l'hémoculture. Le milieu Bactec Fungal Medium améliore la sensibilité de détection de la croissance des espèces difficiles (*C. neoformans*, *C. glabrata*, *Fusarium*, *Penicillium marneffeii* et autres champignons filamenteux). Ce milieu comporte du chloramphénicol et de la tobramycine, inhibant la croissance des bactéries habituellement retrouvées au cours des septicémies bactériologiques -

fongiques, ainsi qu'un agent lytique conduisant au relargage des champignons endocellulaires.

Le système Isolator de lyse -centrifugation est aujourd'hui la meilleure méthode de détection des fongémies, en particulier pour la mise en évidence de *Histoplasma capsulatum* et de *Cryptococcus neoformans*. Il convient également au diagnostic des fongémies à *Malassezia furfur*, aux fusarioses et pénicillioses. Le choix d'un procédé et d'un milieu d'hémoculture doit prendre en compte différents éléments, tels que la taille du laboratoire, la proportion et le nombre de malades à risques.

Ainsi, il est nécessaire de rappeler que les *Candida spp* restent des espèces fongiques majoritairement retrouvées, et de loin, en pathologie fongique. Pour ces espèces, les différents systèmes d'hémoculture (conventionnels, Bactec ou Isolator) présentent des efficacités sensiblement équivalentes. [17]



### 3. METHODOLOGIE

#### 3. 1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de l'Hôpital Gabriel TOURE situé en plein centre de Bamako. En 1959, l'ancien Dispensaire Central de Bamako a été érigé en hôpital. Il sera baptisé «Hôpital Gabriel TOURE» en hommage au sacrifice d'un jeune étudiant Soudanais en Médecine mort d'une épidémie de peste, maladie qu'il contracta au cours de son stage en 1934. L'Hôpital Gabriel TOURE a été érigé en Etablissement public à caractère Administratif (EPA) en 1992, doté de la personnalité morale et de l'autonomie de gestion. L'Hôpital Gabriel TOURE est l'un des onze (11) établissements publics à caractère Hospitalier (EPH) institués par la loi n° 94-009 du 22 mars 1994 modifiée par la loi n°02-048 du 12 juillet 2002 portant création du Centre Hospitalier Universitaire (CHU). Le laboratoire comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle pour les prélèvements et la parasitologie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde, un bureau du chef de service. En 2001 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.
- 2 automates d'hémocultures Bactec 9050 (Labo- CVD);
- 1 incubateur à CO<sub>2</sub> pour les bactéries aéro-anaérobies (Labo- CVD);
- 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 ;
- des pharmaciens ;
- des internes ;
- des assistants de biologie ;
- des techniciens supérieurs ;
- un personnel de surface.

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

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).

### 3. 2. Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective sur cinq 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 (pleural, articulaire, tissulaire et osseux) est réalisé.

### 3. 3. Durée de l'étude

L'étude a été réalisée sur une période de cinq ans : de Février 2002 à décembre 2006.

### 3. 4. Critères d'inclusion et de non - inclusion

#### 3. 4. 1. Critères d'inclusion

Cette étude a porté 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 sollicité pour les enfants âgés de moins de 13 ans ;
- l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est obligatoire.

#### 3. 4. 2. Critères de non- inclusion

N'ont pas été inclus dans l'étude :

- les nouveau- nés malades n'ayant jamais quitté l'HGT depuis leur naissance ;
- les enfants âgés de 13 à 16 ans incapables ou refusant de donner tout consentement, pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- les enfants dont le parent ou l'accompagnateur était incapable ou refusait de donner un assentiment.

### 3. 5. Méthode et Matériel

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 [5]

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). [26]



Figure 2 : Bactec 9050

Il existe 5 types de flacons Bactec :

- BD Bactec TM PLUS /F
- BD Bactec TM LYTIC/10 Anaebic/F
- BD Bactec TM PEDS PLUS /F
- BD Bactec TM MYCOSIS- IC/F
- BD Bactec TM MYCO/F LYTIC

Le flacon BD Bactec TM PEDS PLUS /F a été utilisé pour sa conception à la détection des germes pathogènes courants chez les enfants, ceci exclut d'autres pathogènes dont la détection est assurée par les autres types de flacons Bactec.



Figure 3 : Flacon 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- caséine	2,75 %
Extrait de levure	0,25 %
Digestion de tissu animal	0,10 %
Pyruvate de sodium	0,10 %
Dextrose	0,06 %
Sucrose	0,08 %
Hémine	0,0005 %
Méladione	0,00005 %
Polyanéthol Sulfonate de Sodium (PSS)	0,020 %
Chlorhydrate de pyridoxal (vitamine B6)	0,001 %
Résine absorbante non ionique	10,0 %
Résine échangeuse de cations	0,60

### 3. 6. Protocole de Technique des hémocultures positives

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le Bactec 9050 indique que l'hémoculture est positive.

1. la bouteille est retirée du Bactec 9050. La capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool et une aiguille de subculture est insérée à travers cette capsule. Une lame de frottis est préparée pour la coloration de Gram. L'échantillon de sang estensemencé en utilisant les milieux suivants :

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

Le numéro du Bactec, les initiales du patient ainsi que la date sont inscrits sur chaque boîte ;

2. tous les résultats sont reportés sur la fiche de travail ;

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

- si aucun micro-organisme n'est détecté sur la lame, la bouteille est remise dans le Bactec 9050. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures qui

suivent la sortie du flacon. Dans un délai de 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 micro-organisme n'a toujours pas été identifié ;

- si des micro-organismes sont détectés, la bouteille n'est plus remise dans le Bactec 9050. Les résultats de la coloration de Gram sont portés sur la «fiche de travail hémoculture». 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, un disque de Bacitracine (A) ainsi qu'un disque d'Optochine (P) sont déposés sur la gélose au sang de la subculture ;

6. les boîtes contenant les subcultures sont mises 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, les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées, sont portées sur la fiche de travail ainsi que les résultats de la coloration de Gram effectués et l'aspect de chaque colonie bactérienne ;

8. si des cocci Gram positifs sont observés, se référer à l'organigramme de travail. Il s'agit de :

- un test de catalase est fait. Le résultat est porté sur la fiche de travail ainsi que ceux des tests des disques d'Optochine et de Bacitracine ;

- si le micro-organisme est Catalase positif et ressemble au *Staphylococcus* (cocci Gram positif en grappes), un test de Coagulase est fait. 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), le micro-organisme est enregistré comme étant ***Streptococcus*** Groupe A ;

- si le test à la Bacitracine ou à la catalase est flou, on fait un PYR test. Si le PYR test est positif, le micro-organisme est enregistré comme étant

***Streptococcus*** groupe A ;

- si le microorganisme est catalase négatif, bêta hémolytique, et Bacitracine négatif, on fait des tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B.

Le micro-organisme est enregistré comme étant Streptocoque bêta hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;

- si le microorganisme est catalase négative, Optochine positif (inhibé par le disque d'Optochine) et diplocoque Gram positif, le micro-organisme est enregistré comme étant ***Streptococcus pneumoniae***. Si le test d'Optochine est négatif ou non concluant, on fait un test de «bile solubility». Si le test de solubilité par la bile est positif, le micro-organisme est enregistré comme étant ***Streptococcus pneumoniae***.

Si le microorganisme ressemble au Streptocoque (catalase négative, cocci Gram positif en chaîne), est négatif au test du disque d'Optochine et négatif au test de solubilité par la bile, le PYR test est effectué.

Si le résultat du PYR test est positif, le micro-organisme est enregistré comme étant ***Enterococcus*** species. Si le résultat du PYR test est négatif, le micro-

organisme est enregistré 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. Le micro-organisme est enregistré comme «Bacille Gram Positif » ;

10. si des bactéries Gram négatif sont observées, se référer à l'organigramme suivant :

- si le micro-organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey, un test d'oxydase et une galerie API 20E sont faits. Les *Enterobacteriaceae* (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase négative ; les *Vibrio* et *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou *Vibrio*, le résultat est confirmé 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 au chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, la confirmation est faite 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, *Haemophilus influenzae* est suspecté. Un test d'oxydase et des facteurs X et V sont faits. Si l'identification indique *Haemophilus influenzae*, la confirmation est faite par un test de sérotypage ;

3. 7. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries :

3. 7. 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 microorganismes Gram positif et en microorganismes 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. une lame propre est utilisée. La lame est identifiée à l'aide d'un crayon de papier (le numéro de dossier du patient, la date et l'initial du technicien). On n'utilise pas de stylo à bille ;
2. un frottis mince est confectionné sur la lame de verre. Il est séché à l'air libre (la lame ne doit pas être chauffée 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. le Violet de Gentiane est mis sur le frottis de la lame pendant 30 à 40 secondes ;
5. le surplus de la solution de Violet de Gentiane est versé et la lame est rincée avec un jet d'eau faible. L'excès d'eau est égoutté à l'aide d'un papier buvard. Il

faut utiliser un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;

6. la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) est mise pendant 30 à 40 secondes;

7. la solution de Lugol est versée et la lame est la rincée 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, la lame est rincée avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;

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

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

11. la safranine est versée et la lame est rincée en la tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau. Prudemment, la lame est séchée avec d'un papier buvard. Ne pas surtout froter la lame pour la faire sécher.

### Interprétation

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

Par exemple

Cocci Gram positif en grappes = *Staphylococcus*

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

Cocci Gram positif en chaînettes = *Streptococcus*.

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

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

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

Bacilles Gram positif = 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 paire (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.*

### 3. 7.2. Tests biochimiques et métaboliques

- Observation de la réaction d'Hémolyse

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

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

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

Alpha- hémolyse : C'est une lyse incomplète des globules rouges. L'espace autour de la colonie bactérienne apparaîtra verdâtre.

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

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

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

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

- Catalase

Principe

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

Matériels et réactifs utilisés :

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

Procédure

Une colonie bactérienne est prise de la gélose avec une anse en faisant très attention pour ne pas prendre de la gélose. Sur une lame de verre propre, placer cette colonie.

Une goutte de peroxyde d'hydrogène à 3% est déposée sur cette colonie. Une réaction positive est indiquée par des bulles qui se dégagent en 10 secondes.

Interprétation

Réaction positive = Formation de bulles (exemple : *Staphylococcus*)

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

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

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

Test de la Coagulase :

Le test de la coagulase est utilisé pour séparer *Staphylococcus aureus* de tous les autres Staphylocoques (exemple : Staphylocoque à coagulase négative appelé Staphylocoque spp). Ceci est une distinction importante parce que *Staphylococcus aureus* est l'espèce de Staphylocoque responsable de la plupart des infections. Deux tests de la coagulase peuvent être réalisés : le test de la coagulase sur lame et le test de la coagulase dans le tube .Le test de la coagulase sur lame doit être réalisé en premier. Si celui-ci est négatif réaliser le même test dans le tube

Test de la Coagulase sur lame

Procédure :

1. Mettre une petite goutte d'eau sur la lame.
2. Préparer une suspension épaisse de bactéries dans l'eau.
3. Si les bactéries restent collées ensemble dans l'eau alors le test de la coagulase sur lame ne sera pas réalisé. Jeter les lames et réaliser un test de la coagulase dans le tube.
4. Si une suspension homogène est faite dans l'eau, alors mélanger une petite goutte de plasma avec la suspension bactérienne.

Interprétation :

Réaction positive : La suspension bactérienne agglutinera dans le plasma entre 10 à 15 secondes.

Réaction négative : La suspension bactérienne n'agglutinera pas.

Test de la Coagulase dans le tube

Procédure :

1. Mettre environ 0.5ml de plasma pour coagulase dans un tube stérile.

2. Collecter avec une anse plusieurs colonies bactériennes et les mettre en suspension dans le plasma. La réaction se produira plus rapidement si la suspension bactérienne est dense.
3. Placer le tube dans l'incubateur et l'examiner après 2 heures, 4 heures et 24 heures. Si la réaction est positive au bout de 2 ou de 4 heures, il n'est plus nécessaire d'incuber plus longtemps.

Interprétation :

Réaction positive= Gélification du plasma.

Ceci peut apparaître comme une masse flottante dans le tube ou bien le plasma en entier formera un gel permettant au tube d'être complètement renversé.

Chacune de ces réactions est considérée comme Positive.

Réaction négative= pas de prise en masse du plasma au bout de 24 heures.

*Staphylococcus aureus* peut produire deux enzymes : la Coagulase qui est mesurée dans ce test, et la Staphylokinase qui peut dissoudre le caillot. Il est important d'examiner le tube au bout de 2 ou 4 heures parce qu'un caillot peut se former dans les premières heures et par la suite être dissout par la fibrinolyse. Tout caillot qui se forme est considéré comme une réaction positive.

Contrôle de Qualité :

Une suspension épaisse doit être utilisée pour les deux tests de la coagulase.

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* auront un test de la coagulase sur lame négatif. Donc tous les tests de la coagulase sur lame négatifs doivent être confirmés avec le test de la coagulase dans le tube.

### 3. 8. Conservation des souches : [21]

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 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 :

- la dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou mieux en les scellant au chalumeau ;
- 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) ;
- le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée, ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot, ensemencée par piqûre centrale.

Ainsi peut-on procéder avec les bactéries à croissance rapide comme le sont les Entérobactéries, les Staphylocoques, etc. Pour de nombreux autres germes, on 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 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. Nos souches sont conservées dans un congélateur de moins 65°C à moins 90°C.

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D
N° B-P
N° D et G I
I /E <sub>2</sub>

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 /E<sub>2</sub> : initiale du patient /Etude2

### 3. 9. 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 de facteurs X, V et X+V, disque d'Optochine, disque de Bacitracine

#### 4. Résultats :

- 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 :

1- Fréquence des prélèvements

2- Germes identifiés dans les prélèvements

3- Identification et fréquence des contaminants

## 1- Fréquence des prélèvements

TABLEAU I : Total des prélèvements d'hémocultures effectuées de 2002 à 2006

Années	Prélèvements d'hémocultures	
	Effectifs	Fréquence
2002	1960	14,03
2003	1672	11,97
2004	1843	13,19
2005	4087	29,27
2006	4364	31,24
Total	13965	100

Les prélèvements vont croissant de 2003 à 2006.

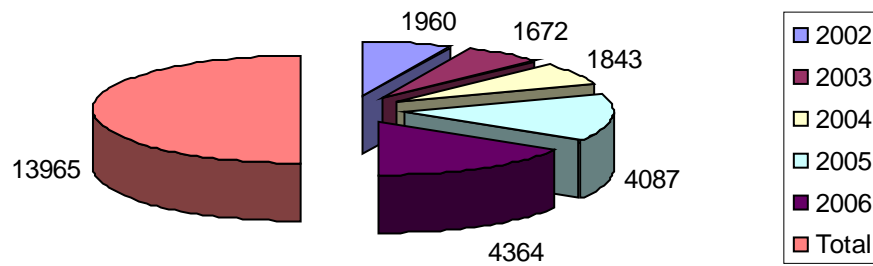


Figure 4: Représentation graphique du nombre total de prélèvements d'hémocultures effectuées de 2002 à 2006

TABLEAU II: Résultat total des Hémocultures de 2002 à 2006

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
Hémocultures	Bactec positif	Cultures avec germes	2131	15,26
		Cultures avec contaminants	846	6,06
		Cultures négatives	39	0,28
	Total		3016	
Total	Bactec négatif	Cultures négatives	10949	78,40
			13965	100,00

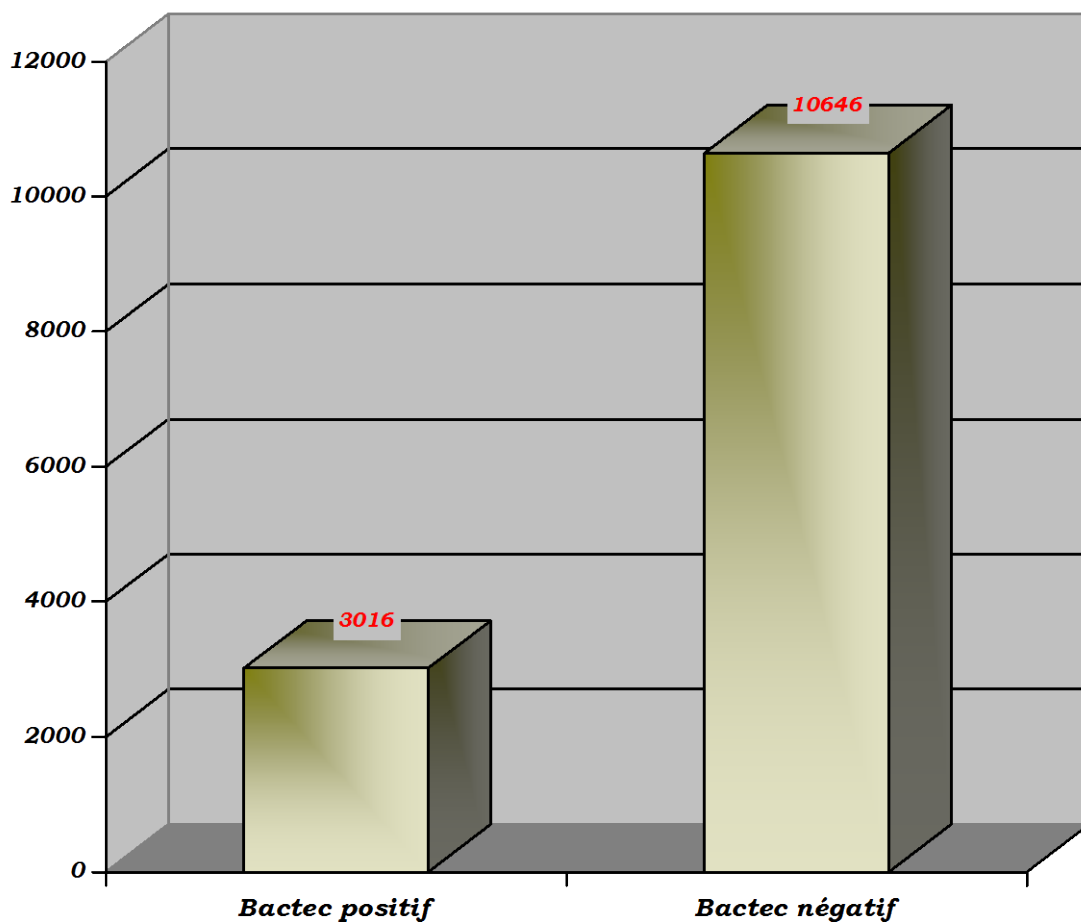


Figure 6 : Représentation graphique du nombre positif et négatif des hémocultures

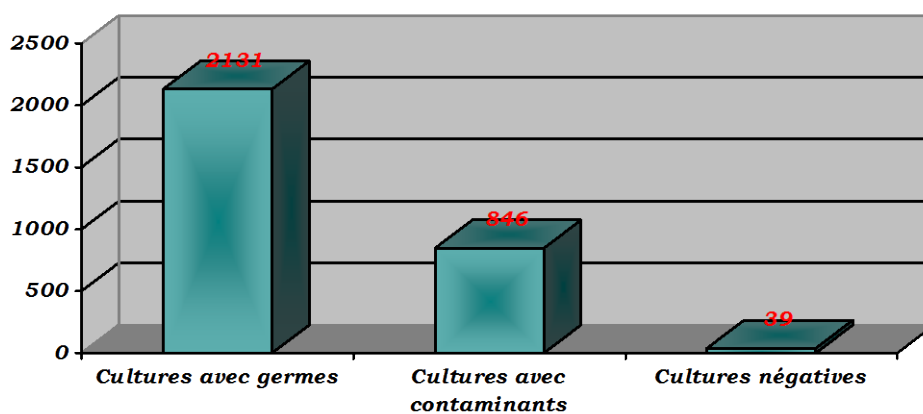


Figure 7 : Représentation graphique du nombre de culture avec germes, contaminants et cultures négatives



TABLEAU III : 2-Résultats des germes isolés des hémocultures

DESIGNATIONS	ANNEES					Total	%
	2002	2003	2004	2005	2006		
<b>Total</b>	<b>1978</b>	<b>1672</b>	<b>1843</b>	<b>4097</b>	<b>4375</b>	<b>13965</b>	<b>100</b>
<b>Résultats négatifs</b>	1471	1182	1328	3329	3639	<b>10949</b>	<b>78,40</b>
<b>Résultats positifs</b>	507	490	515	768	736	<b>3016</b>	<b>21,60</b>
<b>Nature des germes isolés</b>							
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	78	100	115	178	221	<b>692</b>	<b>4,96</b>
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	12	99	122	148	96	<b>477</b>	<b>3,42</b>
<i>Salmonella</i> spp	60	48	39	28	52	<b>227</b>	<b>1,63</b>
<i>Salmonella typhi</i>	56	20	13	50	25	<b>164</b>	<b>1,17</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	29	27	49	38	<b>166</b>	<b>1,19</b>
<i>Escherichia coli</i>	17	08	17	28	23	<b>93</b>	<b>0,67</b>
<i>Salmonella paratyphi</i> B	16	11	06	46	45	<b>124</b>	<b>0,89</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	03	05	04	04	<b>19</b>	<b>0,14</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	03	06	02	02	05	<b>18</b>	<b>0,13</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> W135	02	08	01	00	00	<b>11</b>	<b>0,08</b>
<i>Streptococcus</i> non hemolytique	03	06	01	00	00	<b>10</b>	<b>0,07</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe A	01	04	04	02	09	<b>20</b>	<b>0,14</b>
<i>Streptococcus</i> β- hemolytique groupe A	03	02	03	02	03	<b>13</b>	<b>0,09</b>
<i>Enterococcus</i> spp	01	01	05	03	03	<b>13</b>	<b>0,09</b>
<i>Streptococcus</i> β- hémolytique groupe B	04	01	01	00	00	<b>06</b>	<b>0,04</b>
<i>Morganella morganii</i>	01	02	02	02	00	<b>07</b>	<b>0,05</b>
<i>Citrobacter species</i>	02	01	01		01	<b>05</b>	<b>0,03</b>
<i>Citrobacter freundii</i>	01	00	02	02	02	<b>07</b>	<b>0,05</b>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	01	01	01	00	00	<b>03</b>	<b>0,02</b>
<i>Salmonella arizonae</i>	01	01	01	00	00	<b>03</b>	<b>0,02</b>
<i>Salmonella paratyphi</i> A	01	01	01	02	02	<b>07</b>	<b>0,05</b>
<i>Pseudomonas putida</i>	00	01	01	00	01	<b>03</b>	<b>0,02</b>
<i>Salmonella paratyphi</i> C	01	00	01	02	01	<b>05</b>	<b>0,03</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	01	01	00	04	04	<b>10</b>	<b>0,07</b>
<i>Neisseria meningitidis</i> groupe C	00	00	01	00	00	<b>01</b>	<b>0,007</b>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	00	00	01	01	00	<b>02</b>	<b>0,014</b>
<i>Proteus mirabilis</i>	00	00	00	01	00	<b>01</b>	<b>0,007</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	00	00	00	01	00	<b>01</b>	<b>0,007</b>
<i>Acinetobacter calcovar</i>	00	00	00	02	01	<b>03</b>	<b>0,02</b>
<i>Serratia liquefaciens</i>	00	00	00	00	01	<b>01</b>	<b>0,007</b>
<i>Flavobacter odoratum</i>	00	00	00	00	02	<b>02</b>	<b>0,014</b>
<i>Aeromonas</i> spp	00	00	00	00	01	<b>01</b>	<b>0,007</b>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	00	00	00	01	01	<b>02</b>	<b>0,014</b>
<i>Shigella</i> spp	00	00	00	01	01	<b>02</b>	<b>0,014</b>
<i>Streptococcus</i> spp	00	00	00	02	02	<b>04</b>	<b>0,03</b>
<b>Contaminants :</b>							
<i>Staphylococcus</i> à coagulase négatives	143	119	123	156	143	<b>684</b>	<b>4,89</b>
Bacilles Gram Positif (BGP)	54	16	18	40	30	<b>158</b>	<b>1,13</b>
Levures	01	01	01	01	00	<b>04</b>	<b>0,03</b>

### 3- Fréquence des contaminants

TABLEAU IV : Récapitulatif des micro- organismes à l'origine de contaminations des hémocultures

PERIODE	ANNEES						
	2002	2003	2004	2005	2006	Total	%
Contaminants							
Staphylococcus à coagulase négative (SCN)	143	119	123	156	143	684	80,85
Bacilles Gram Positifs (BGP)	54	16	18	40	30	158	18,67
Levures	01	01	01	01	00	04	0,47
Total	198	136	142	197	173	846	100,00

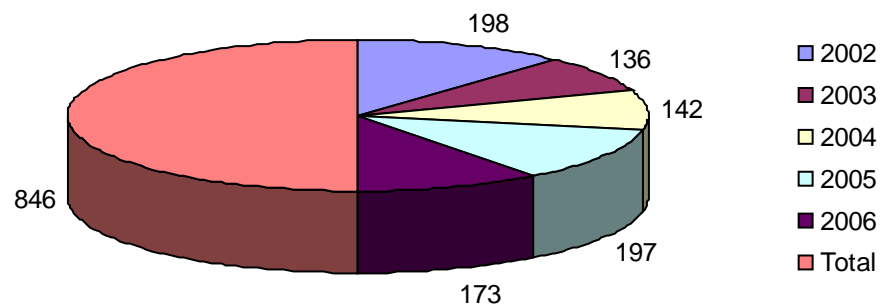


Figure 7: Représentation graphique des germes ayant contaminé les hémocultures de 2002 à 2006

**TABLEAU V-a : Fréquence d'isolement des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures de Février 2002 à Décembre 2002**

Mois	ANNEE 2002													Total	Fréquence
	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct	Nov	Déc			
Contaminants															
SCN	-	1	35	13	11	8	16	15	13	13	10	8	143	88,51	
BGP	-	0	6	3	5	6	5	7	7	4	6	5	54	11,49	
Levures	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,00	
Total	-	1	41	16	16	15	21	22	20	17	16	12	198	100,00	
Pourcentage des contaminants		2,22%	17,67%	9,20%	5,52%	11,62%	11,11%	11,11%	12,12%	8,25%	8,00%	9,10%			
Total des prélèvements		45	232	174	290	129	189	198	165	206	200	132			

TABLEAU V- b : Taux de Variation des contaminants au cours de la période 2002

Mois	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pourcentage des contaminants	2,22 %	17,67 %	9,20%	5,52 %	11,62 %	11,11 %	11,11 %	12,12%	8,25%	8,00%	9,10 %
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

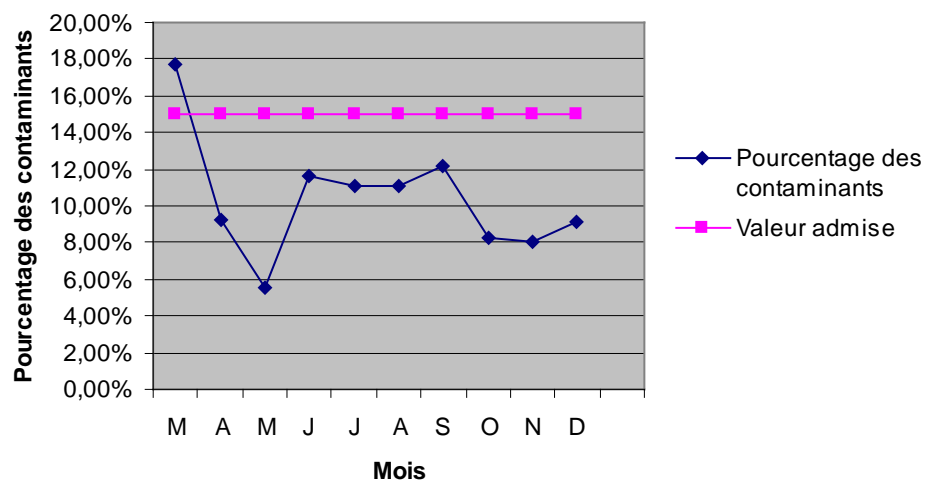


Figure 8: Représentation graphique des taux de contaminants au cours de la période 2002

**TABLEAU VI-a : Fréquence d'isolement des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures de Janvier 2003 à Décembre 2003**

Mois	ANNEE 2003													
	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	Total	Fréquence
SCN	9	10	11	12	9	8	13	15	9	12	6	5	119	89,92
BGP	1	2	2	1	0	1	2	3	2	1	1	0	16	9,30
Levures	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,78
Total	10	12	13	14	9	9	15	18	11	13	7	5	136	100,00
Pourcentage des contaminants	10,10%	10,71%	5,46%	7,40%	5,66%	7,14%	10,48%	13,04%	7,38%	10,00%	8,23%	4,80%		
Total des prélèvements	99	112	238	189	159	126	143	138	149	130	85	104		

TABLEAU VI-b: Taux de Variation des contaminants au cours de la période 2003

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pourcentage des contaminants	10,10%	10,71%	5,46 %	7,40 %	5,66 %	7,14%	10,48%	13,04%	7,38%	10,00%	8,23 %	4,80%
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

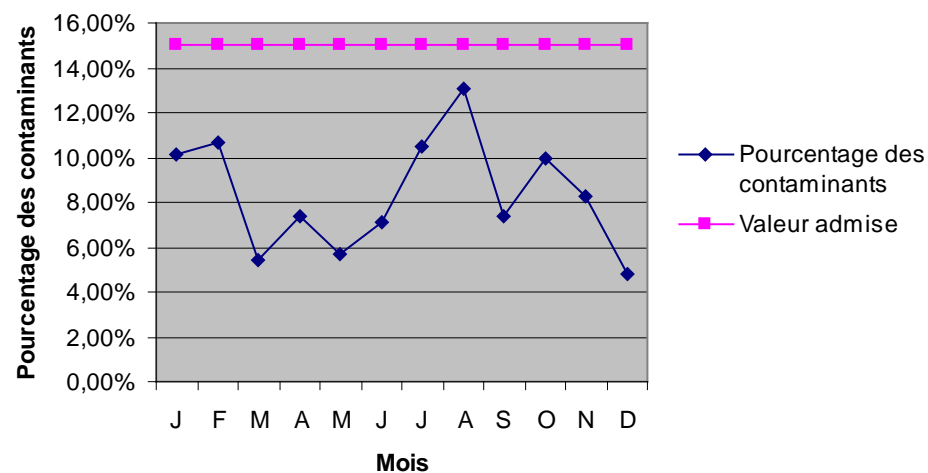


Figure 9: Représentation graphique des taux de contaminants au cours de la période 2003

TABLEAU VII- a: Fréquence d'isolément des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures de Janvier 2004 à Décembre 2004

Mois	ANNEE 2004													
	Jan	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct.	Nov.	Déc.	Total	Fréquence
SCN	3	1	25	12	10	8	15	13	9	12	9	6	123	87,68
BGP	1	0	0	0	0	2	3	5	2	2	3	0	18	12,32
Levures	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,00
Total	4	1	25	13	10	11	18	18	11	14	12	6	142	100,00
Pourcentage des contaminants	5,88%	0,96%	14,20%	7,30%	3,89%	9,40%	15,25%	12,75%	7,48%	7,60%	6,38%	3,64%		
Total des prélèvements	68	104	176	178	257	117	118	141	147	184	188	165		

QTABLEAU VII-b : Taux de Variation des contaminants au cours de la période 2004

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pourcentage des contaminants	5,88 %	0,96 %	14,20 %	7,30%	3,89 %	9,40%	15,25 %	12,75 %	7,48%	7,60%	6,38%	3,64 %
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

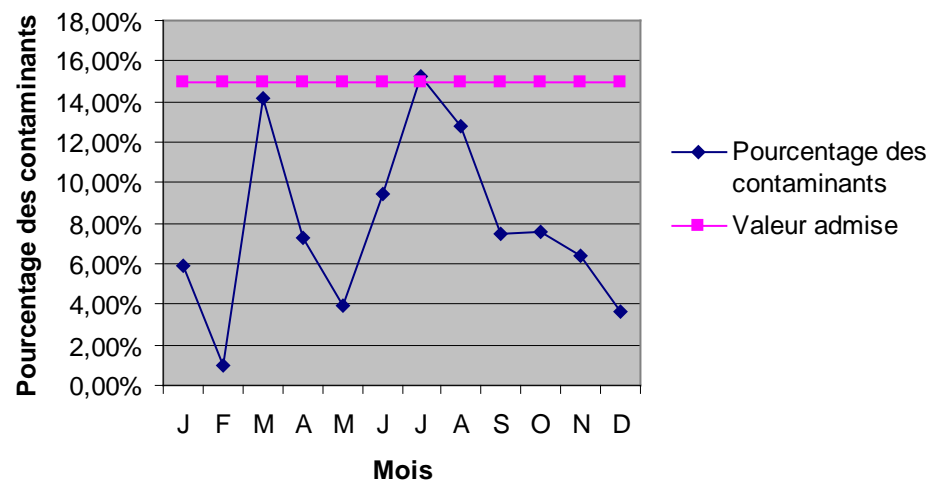


Figure 10: Représentation graphique des taux de contaminants au cours de la période 2004



TABLEAU VIII- a : Fréquence d'isolément des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures de Janvier 2005 à Décembre 2005

Mois	ANNEE 2005												Total	Fréquence
	Jan	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct.	Nov.	Déc.		
Germes	Jan	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct.	Nov.	Déc.	Total	Fréquence
SCN	8	7	12	15	13	10	18	18	17	16	13	9	156	78,86
BGP	4	2	3	2	2	5	4	6	3	3	5	1	40	20,62
Levures	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,52
Total	12	9	15	17	15	15	22	24	21	19	18	10	197	100,00
Pourcentage des contaminants	9,75 %	5,84 %	7,89 %	7,76 %	6,45 %	4,03 %	3,88 %	2,93 %	4,34%	6,17%	5,44%	3,45%		
Total des prélèvements	123	154	190	219	232	372	566	818	484	308	331	290		

TABLEAU VIII- b : Taux de Variation des contaminants au cours de la période 2005

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pourcentage des contaminants	9,75 %	5,84 %	7,89%	7,76%	6,45 %	4,03%	3,88%	2,93%	4,34%	6,17%	5,44%	3,45 %
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

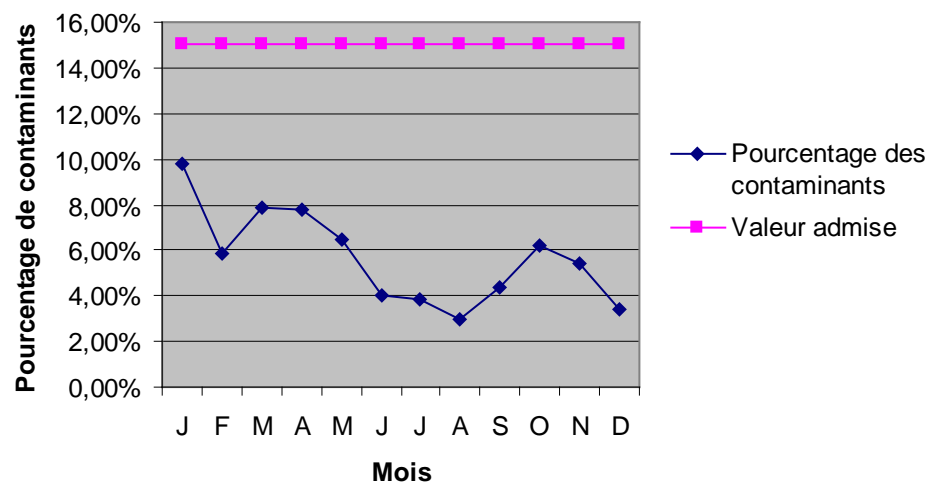


Figure 11: Représentation graphique des taux de contaminants au cours de la période 2005

TABLEAU IX- a : Fréquence d'isolément des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures de Janvier 2006 à Décembre 2006

Mois	PERIODE D'ANNEE 2006													
	Jan	Fév	Mars	Avril	Mai	Juin	Juillet	Août	Sept	Oct	Nov	Déc	Total	Fréquence
Contaminants	05	01	34	12	8	05	13	14	12	15	13	11	143	80,79
SCN	05	01	34	12	8	05	13	14	12	15	13	11	143	80,79
BGP	04	2	04	01	01	02	01	03	01	04	03	04	30	19,21
Levures	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	00	0	0,00
Total	09	03	38	13	09	07	14	17	13	19	16	15	173	100,00
Pourcentage des contaminants	3,75%	0,92%	8,46%	2,57%	2,08%	2,35%	4,48%	4,61%	3,33%	4,60%	4,82%	5,03%		
Total des prélèvements	240	326	449	506	431	298	312	369	390	413	332	298		

TABLEAU IX-b : Taux de Variation des contaminants au cours de la période 2006

Mois	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Pourcentage des contaminants	3,75 %	0,92 %	8,46%	2,57%	2,08 %	2,35%	4,48%	4,61%	3,33%	4,60%	4,82%	5,03 %
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%

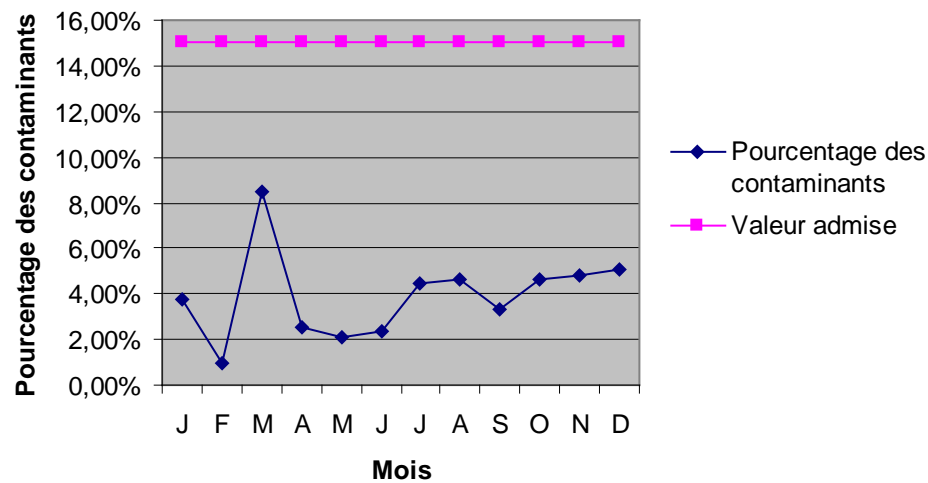


Figure 12: Représentation graphique des taux de contaminants au cours de la période 2006

## 5. Commentaires et discussion :

Les résultats de notre étude nous permettent de faire un certain nombre de commentaires et discussions :

- Du point de vue des prélèvements :

Les prélèvements d'hémoculture sont effectués dans les services cliniques, notamment dans le service de pédiatrie dans le Box de CVD par un personnel qualifié. Ce personnel suit un mode opératoire normalisé ou «Standard Operating Procedures (SOP)» dont l'objectif principal est de fournir les instructions pour un prélèvement de sang sécurisé et approprié chez les enfants afin de détecter la présence de bactéries.

Ainsi le site de la ponction veineuse est nettoyé d'abord avec un tampon d'alcool, puis nettoyé avec un tampon de Bétadine<sup>®</sup> de façon centrifuge à partir du point d'insertion de l'aiguille, permettant à la Bétadine<sup>®</sup> de rester en contact avec la peau jusqu'à séchage. Ce procédé nous permet d'éliminer les bactéries de la peau notamment les Staphylocoques de la peau, les bactéries Corynéformes de la peau etc... pouvant contaminer les prélèvements. Le matériel utilisé est stérile.

Ainsi, pour éviter une contamination, nous avons préconisé une technique de prélèvements appropriée, comme suit :

- On insère l'aiguille stérile de dimension 20 à 24 G dans la veine et on prélève la quantité recommandée de sang dans une seringue stérile. Les dimensions de seringue recommandées en fonction de l'âge sont les suivantes : 3cc pour les enfants âgés de moins de 12 mois ; 5cc pour les enfants âgés de 12 à 47mois et 10cc pour les enfants de plus 47mois. Les quantités de sang à prélever recommandées en fonction de l'âge sont les suivantes : pas moins d'un ml pour les enfants âgés de 12 mois ; pas plus de 3 ml pour les enfants âgés de 12 à

47mois et 5 ml pour les enfants âgés de plus de 47mois. La quantité maximale de sang à mettre dans le flacon pédiatrique BACTEC est 5 ml.

Tout volume de sang obtenu, sans tenir compte de sa petite quantité, sera mis dans le flacon d'hémoculture.

- on enlève l'aiguille de la seringue et on la jette avec soins dans la poubelle à aiguilles ; adapter une aiguille stérile de 20 de transfert à la seringue. On insère avec soins l'aiguille de transfert, maintenue adaptée à la seringue contenant du sang, dans le bouchon plastique du flacon pédiatrique BACTEC d'hémoculture et on vide entièrement le contenu de la seringue dans ce flacon.

- On retire l'aiguille du flacon d'hémoculture et on jette avec soins aiguille et seringue dans la poubelle à seringue.

- On intervertit doucement le flacon d'hémoculture 2 à 3 fois pour mélanger le sang avec le milieu de culture.

- On note l'heure et la date du prélèvement, la quantité prélevée, et le site de la ponction veineuse dans des supports appropriés.

- On transporte le flacon rapidement au laboratoire de bactériologie CVD.

Ce mode de prélèvements à but d'éviter la contamination des hémocultures. [8]

- Du point de vue Méthodologie :

Les sangs prélevés dans des bouillons nutritifs sont 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 [3] Les résultats des hémocultures positives sont portés immédiatement à la connaissance des prescripteurs de la pédiatrie.

L'identification des germes se fait à partir des flacons BACTEC positifs par les méthodes de culture et d'identification classiques des bactéries.

- Du point de vue résultats :

Au terme de cette étude nous avons obtenu les résultats suivants : Le nombre total de prélèvements effectués est de : 13965 de 2002-2006. SIDIBE Mayrama a analysé 1113 hémocultures chez 1014 patients de 1993 à 1998, étude réalisée dans le cadre du «bilan de six années d'hémoculture au laboratoire de l'Hôpital National du Point G en 2000» Sur les 13965 prélèvements effectués, le nombre de flacons de Bactec positifs est 3016 soit 21,60% des prélèvements. Le nombre de flacons de Bactec négatifs est de 10949 soit 78,40% des prélèvements. Au terme de la première étape de culture, une coloration de Gram est effectuée sur tous les flacons positifs. Les frottis de sang effectués à partir des flacons de Bactec positifs ont donné les résultats suivants : Le nombre de frottis de sang ayant donné un résultat positif est de 2131 soit 70,66% des flacons positifs. Ce taux montre que le type d'incubation et de suivi des bouillons Bactec a une bonne corrélation avec le développement des microorganismes. La positivité des examens bactériologies n'est affirmée que sur la base des examens de culture sur les milieux solides d'identification et d'isolement. Ainsi, le nombre de germes après culture et identification est égal au nombre de germes isolés soit 2977. Ce chiffre correspond à 70,66% des flacons positifs et 15,26% de l'ensemble des prélèvements. Le nombre des bactéries à l'origine de contaminations des

hémocultures est 846 soit 6,06% dans l'ensemble. Ce taux est inférieur à la valeur admise 15% [29].

Ainsi, dans notre étude nous avons obtenus 684 *Staphylococcus* à coagulase négatives soit 4,91% de l'ensemble de nos germes. Ce pourcentage est considéré comme le taux de contaminations par des Staphylocoques non aureus. Notre approche consiste à différencier *Staphylococcus aureus* des Staphylocoques à coagulase négative. Dans l'étude de SIDIBE Mayrama les Staphylocoques sont évalués par rapport à l'ensemble des Cocci Gram Positif ce qui lui permet d'obtenir 38,46 % comparé à ceux des Abidjanais, BISSAGNENE et collaborateurs qui ont la même approche pour *Staphylococcus aureus* obtenant un taux de 33,3% sur 44,4% de Cocci Gram positif isolés. [7]

- Les Bacilles Gram Positifs ont représentés 1, 13% soit 158 souches isolées de 2002 à 2006. Une identification précise de ces souches de BGP n'est pas effectuée. Dans l'étude de SIDIBE Mayrama, les Bacilles Gram Positifs ont été représentés surtout par *Corynebacterium spp* 66,67% suivies par *Clostridium perfringens* 22,22 % contre 11,11 % de *Propionibacterium acnes*. A Dakar, selon KI- ZERBO et collaborateurs, *Clostridium perfringens* représente l'ensemble des Bacilles Gram Positif isolés, 18 souches soit 1,82% des isolats. [19] Parmi les BGP isolés de notre laboratoire, *Listeria monocytogenes* pouvant être responsable de suspicions d'infections bactériennes invasives (SIBI) doit être recherché par une technique de Camp test.

- Les levures ont représentés 0,03 % soit 4 souches isolées de 2002 à 2006. A Dakar, KI- ZERBO et collaborateurs ont fait la même remarque au CHU de Dakar Fann avec également une seule fongémie à candida. [7] Aussi dans l'étude faite par GOULET en France en 1983, les levures ont représentés 0,8% des isolats. [16]



*Etude des contaminants des hémocultures, au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Touré de 2002 à 2006*

L'isolement des levures dans les hémocultures pourrait être attribuée à l'immunodépression due au VIH- Sida de plus en plus fréquente dans notre contexte.

## 6. Conclusion :

Les laboratoires de biologie clinique développent de plus en plus des techniques microbiologiques visant à déceler et à identifier des bactéries ou autres microorganismes cultivables sur des milieux appropriés, à partir de prélèvements sanguins. Le microorganisme isolé par le technicien n'est pas toujours à l'origine de la maladie mais plutôt provient soit du site de prélèvement ou des manipulations de paillasse. Le profil de certains germes de cette étude nous le montre en ce qui concerne la majorité des staphylocoques à coagulase négative (SCN) qui sont des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales. D'autres comme les champignons sont de plus en plus fréquemment responsables d'infections nosocomiales et communautaires. Les Corynébactéries non- pathogènes, hôtes normaux de la peau et des muqueuses peuvent être isolés des hémocultures comme des contaminants correspondant aux BGP. Ainsi le taux de contamination moyenne obtenu soit 6,06% se situe dans la zone habituellement admise inférieure à 15%. De 2002 à 2006 elle ne cesse de baisser et se maintenir dans une zone acceptable ce qui dénote de la qualité aussi bien de la technique de prélèvement que de la méthode de travail au laboratoire.

7. Références :

1. APPITT. Bactériémie, sepsis et choc septique, 15<sup>ème</sup> édition. PILLY E, Montmorency : 2M2 ; 1996 :19-25.
2. AZELE F. Bactériologie à l'usage des étudiants en médecine 3eme édition - 1970 :35- 37
3. BECTON, DICKINSON and Company. BACTEC 9050 Manuel d'utilisation. MA-0103. Révision : E Réf 445845. Septembre 20040.
4. BECTON D. Technologie Resine Bactec. J. Spaargaren, et al ; Effectiveness of Resin in Neutralizing ; Antibiotic Activities in BACTEC Plus ; Aerobic/F culture ; Media ; JCM, décembre 1998 : 3731- 33.
5. BERCHE P, GAILLARD J L, SIMONET M. Les Bactéries des infections humaines. Médecine Science Flammarion 4, rue Casimir Delavigne 750060 Paris 1988 : 304.
6. bioMérieux B V. Bactériologie Mars 2003.Réf. 247003.
7. BISSAGNENE E, GRE T, MOREAU J, EDOH V, AOUSSI E, ODEHOURI K et al. Septicémie de l'adulte. Problèmes diagnostiques, thérapeutiques et pronostiques : à propos de 18 cas. Pub Med Afr 1987 : 13-20.
8. CENTRE POUR LE DEVELOPPEMENT DES VACCINS-MALI  
METHODE STANDARD DE PROCEDURES CLINIQUES  
OPERATIONNELLES Titre : Obtention de sang pour culture SOP#  
M30X.XX Préparé par : Samba Sow, MD MS Date d'Approbation : en cours  
Approuvé par : en cours.
9. CAQUET R. Guide pratique des examens de laboratoire. Médiguides, 122-123. La Gazette médicale, le généraliste.

10. ISABELLE V, GERARD L, YVES G, FRANÇOIS. Article, Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, Lyon. Cours de Bactériologie Médicale 1998, 20 :112.

11. ISABELLE VERDIER, GERARD LINA, YVES GILLET- Article Staphylocoques, Service de Pédiatrie, Hôpital Edouard Herriot, Lyon. Cours de Bactériologie Médicale 2000.

12. DIDIER PITTET, GENEVE; CHRISTIAN RUEF, ZÜRICH. Bactériémies nosocomiales (Partie 1). Volume 5, Numéro 2, Juin 1998.

13. DJEDJE DC. Les septicémies en Médecine Interne au CNHU de Cotonou : Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques à propos de 100 cas. Thèse Med, Cotonou, 2001, N°935, 121.

14. Département d'anesthésie- réanimation chirurgicale, CHU BICHAT CLAUDE- BERNARD, 46, rue HENRI HUCAR, 75018 Paris, France.

15. GOULON M. Abrégés de réanimation médicales, Paris, Masson, 1985 : 194-204.

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

17. [http:// anne. Decoster.free.fr/staph.htm](http://anne.Decoster.free.fr/staph.htm).

18. HUEBNER J, PIER GB, MASLOW et al. Microbiol. Infect Dis 1994; 169: 526-531.

19. KI- ZERBO G A, THIOUB B, DIOP B M, BADIANE S, COLL- SECK A M, SAMB A. Etude des hémocultures positives au CHU de Fann Dakar: Bilan de trois années du laboratoire de Bactériologie. Med Afr Noire 1996 ; 43 : 322-8.

20. LECLERC H, IZARD D, HUSSON O M, WATTRE P, JAKUBCZAK E.

Microbiologie Générale, nouvelle édition 1983-2<sup>e</sup> Tirage.

21. LECLERC H, Microbiologie générale. 2e édition, 1983 : 199- 202

22. LE MINOR, MICHEL V. Bactériologie médicales, 2<sup>e</sup> édition. Chapitre 38. Staphylocoques et Microcoques. 772-793.

23. LOULERGUE J, AVRIL J, OMWANGAD. Hémocultures. In : CARBONNELLE B, DENIS F, MARMONIER A, PINON G et VARGVES R, eds. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Paris : Simep, 1987 ; 41- 50.

24. VERON M. Pseudomonaceae. In : LE MINOR et VERON M, eds. Bactériologie médicale. Paris: Flammarion, 1989 : 555-98.

25. FLEURETTE J. Staphylocoques et Microcoques. In : LE MINOR L et VERON M, eds. Bactériologie médicale. Paris: Flammarion, 1989 : 773-94.

26. MURRAY P R, HOLLICK G E, JERRIS R C, WILSON M, Journal of Microbiology, June 1998: 1601- 03.

27. PITTET D, THIEVENT B, WENZEL RP, LI N, GURMAN G, SUTER. PM. Importance of pre- existing co- morbidities for prognosis of septicemia in critically ill patients. Intensive Care Med 1993: 262-72.

28. RICHARD C. *Flavobacterium*. In: LE MINOR et VERON M, eds. Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, 1989 : 837-931.

29. SAMAKE M. Pratique de l'hémoculture. Thèse Pharm, Bamako, 2003, N° 99.

30. SOUDE S G A A. Bactéries isolées des hémocultures au CNHUM de Cotonou. Thèse Pharm, Bamako, 2005, N° 198.

31. PR. KOONTZ. Article, Centre médical de l'université d'Iowa- Diagn. Microbiol. Infect. Dis 1991, 14 : 111- 18.

*Etude des contaminants des hémocultures, au laboratoire de bactériologie CVD du CHU  
Gabriel Touré de 2002 à 2006*

32. VERON M, POPOFF M. *Vibrionaceae*. In : LE MINOR L, VERON M. eds.  
Bactériologie Médicale. Paris : Flammarion, 1989 : 473-506.

## **FICHE SIGNALÉTIQUE**

**Nom** : Ousmane

**Prénom** : Mahamadou

**Titre de la thèse** : Etude des contaminants des hémocultures, au laboratoire de bactériologie CVD du CHU- Gabriel Touré de 2002 à 2006

**Année Universitaire** : 2007- 2008

**Ville de soutenance** : Bamako

**Pays d'origine** : Mali

**Lieu de dépôt** : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie, et d'Odonto- Stomatologie

**Secteurs d'intérêt** : Bactériologie, santé publique, pédiatrie.

### **8. RESUME :**

La recherche du germe responsable de la bactériémie est le rôle imparti au microbiologiste dans le protocole de diagnostic de l'état bactériémique. Le présent travail a étudié la fréquence d'isolement des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures.

- ✓ Les prélèvements d'hémoculture sont effectués selon un mode opératoire normalisé dont l'objectif principal est de fournir les instructions pour un prélèvement de sang sécurisé et approprié.
- ✓ Les résultats obtenus sont les suivants : le nombre total de prélèvements: 13965 de 2002 à 2006. Le nombre de flacons Bactec positifs est 3016 soit

21,60% des prélèvements positifs. Le nombre de frottis de sang ayant donné un résultat positif est de 2131 soit 70,66% des flacons positifs.

- ✓ Le nombre de germes après culture et identification : 2977. Ce chiffre correspond à 70,66% des flacons positifs et 15,26% de l'ensemble des prélèvements.
  
- ✓ Le nombre des bactéries à l'origine de contaminations des hémocultures est 846 soit 6,06% dans l'ensemble. Ce taux est inférieur à la valeur admise 15%.

Nous avons obtenus 684 *Staphylococcus* à coagulase négatives soit 4,91% de l'ensemble de nos germes.

- ✓ Les Bacilles Gram Positifs ont représentés 1, 13% soit 158 souches isolées de 2002 à 2006.
- ✓ Les levures ont représentés 0,03 % soit 4 souches isolées de 2002 à 2006. L'isolement des levures dans les hémocultures pourrait être attribuée à l'immunodépression due au VIH- Sida de plus en plus fréquente dans notre contexte.

**MOTS CLES** : hémoculture, pédiatrie, Contaminants.



## **FACTS**

**Name:** Ousmane

**First name:** Mahamadou

**Title of the thesis:** Study of the contaminants of blood culture, in the laboratory of bacteriology CVD CHU- Gabriel Toure from 2002 to 2006.

**Academic year:** 2007- 2008

**City of sustenance:** Bamako

**Country origin:** Mali

**Place of deposit:** Library of Medecin, Pharmacy and  
Odonto- stomatology Faculty

**Sectors of interests:** Microbiology, Public health, Infectious, Pediatric.

### **8. Summary:**

The search for germ responsible for bacteremia is the role of the microbiologist in the protocol for diagnosing the condition bacteremia. This work has studied the frequency of isolation of bacteria to cause contamination of blood culture.

- ✓ The removal of blood culture are made according to a standard operating whose main objective is a provide instructions for a safe blood culture collection and appropriate.
- ✓ The results are els: the total number of samples: 13965 of 2002 to 2006. The number of blood culture positive east 3016is 21.60% of samples positive. The number of blood culture flottis having given a positive result of 2131 is 70.66% vials positive. The number of germs after culture and identification: 297. This figure represents 70.66% of vials positive and 15.26% of all levies.
- ✓ The number of bacteria to cause contamination of blood culture is 846 or 6.06% overall.

- ✓ This rate is lower than the permitted 15%.
- ✓ We have obtained 684 of coagulase negative Staphylococci or 4.91% of all our germs. The Gram- Positive Bacilles have represented 1.13% or 158 strains isolated from 2002 to 2006.
- ✓ Yeasts have represented 0.03% or 4 strains isolated from 2002 to 2006. The isolation of yeast in the blood might be attributable to the ummunodeppresion due to HIV/AIDS more and more frequency in our context.

Key words: blood culture, pediatric, contaminants.

## **SERMENT DE GALIEN**

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

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

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

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

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

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

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

**JE LE JURE**