

République du Mali

Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako



Faculté de Pharmacie

Année universitaire 2013-2014

Thèse N°...

**Mise en place d'un système de surveillance des résistances
bactériennes aux antibiotiques: Cas des hémocultures
au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako**

Thèse présentée à la Faculté de Pharmacie par **Mlle Sandrine MOUDJONGUE OMOCK**

pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'ETAT)

Soutenue publiquement le 28 / 06 / 2014

Jury :

Président du jury : M. Flabou BOUGOUDOGO Maître de conférences Agrégé

Membre du jury : M. Ibréhima GUINDO Docteur

Membre du jury : Mme. KAYA Assétou SOUKHO Maître de conférences
Agrégé

Directeur de thèse : M. Souleymane DIALLO II Professeur

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013-2014

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE – MAITRE DE CONFERENCES

VICE-DOYEN : M. Ababacar I .MAIGA-MAITRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY – ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN – CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Boukassoum	HADARA	Législation
M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Massa	SANOGO	Chimie Analytique
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique
M. Abdourahmane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Bréhima	KOUMARE	Bactériologie-virologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie Chef de DER
M. Alassane	DICKO	Santé publique

2. Maître de conférences

M. Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie
M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Ousmane	KOITA	Parasitologie-Moléculaire
M. Abdoulaye	DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Abdoulaye	TOURE	Entomologie Moléculaire-Médicale
M. Akory Ag	IKNANE	Santé publique/Nutrition

3. Maître assistant

Mme Fanta	SANGHO	Santé Communautaire
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Seidina Aboubacar Samba	DIAKITE	Immunologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie

M. Modibo	DAOU	Immunologie
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Klétigui Casmir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie Chef de DER

2. Maître de conférences

M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie analytique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

3. Maître assistant

M. Sékou	BAH	Pharmacologie
----------	-----	---------------

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie analytique
M. Madani	MARIKO	Chimie analytique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie

M. Blaise DACKOUCHE Chimie analytique

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Drissa DIALLO Pharmacognosie

2. Maître de conférences

M. Saibou MAIGA Législation Chef de DER

Mme Rokia SANOGO Pharmacognosie

M. Alou Amadou KEITA Galénique

3. Maître assistant

M. Yaya COULIBALY Législation

M. Loséni BENGALY Pharmacie Hospitalière

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Bacary Moussa CISSE Galénique

M. Bourama TRAORE Législation

M. Hamma Boubacar MAIGA Galénique

M. Hammadou Abba TOURE Bromatologie

M. Adama DENOUCHE Pharmacognosie

M. Mahamane HAIDARA Pharmacognosie

M. Issa COULIBALY Gestion

M. Souleymane DAMA Sciences Pharmaceutiques

M. Antoine DARA Sciences Pharmaceutique

M. Balla Fatogoma COULIBALY Pharmacie Hospitalière

M. Karim TRAORE Sciences pharmaceutique

DER DES SCIENCES FONDAMENTALES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Mahamadou TRAORE Génétique

M. Mamadou KONE Physiologie

M. Sékou Fanta Mady TRAORE Biologie-Génétique-Zoologie

2. Maître de conférences

M. Mouctar DIALLO Biologie/Parasitologie

M. Kaourou DOUCOURE Physiologie

M. Lassana DOUMBIA Chimie minérale

M. Mamadou CISSE Biologie Végétale

3. Assistant/Attaché de recherche

M. Moussa KONE Chimie organique

M. Amidou DOUCOURE Chimie organique

M. Seydou Sassou COULIBALY Biochimie

M. Oumar GUINDO Biochimie

M. Mamadou Lamine DIARRA Botanique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

M. Bouba DIARRA Bactériologie

M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Moussa	SACKO	Biologie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Boubacar	ZIBEIROU	Physique

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr Babacar	FAYE	Pharmacodynamie
Pr Amadou	DIOP	Biochimie
Pr Pascal	BONNABRY	Pharmacie Hospitalière
Pr Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique (en disponibilité)

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

A Mon père : M. OMOCK René-marcel

Cher papa, les mots seuls ne pourraient exprimer l'affection et le respect que je te porte. Tu nous as mis, mes frères et moi, à l'abri du besoin et nous as appris la discipline, le respect de l'autre, l'honnêteté, l'amour du travail bien fait. Surtout, tu m'as montré la voie de ce qu'est un gagnant, voici, que ce travail soit la reconnaissance de tous les efforts et la patience fournis pour nous. Merci, je t'aime.

A Ma mère : Mme EYOLE Ernestine épouse OMOCK

Femme douce ; généreuse ; attentionnée et bonne conseillère. Tu as été, maman, une épaule sur laquelle je me suis toujours reposé dans les bons et les mauvais moments. Merci d'avoir été toujours une source de persévérance et d'amour pour moi ; que le Seigneur Dieu vous bénisse papa et toi. Ceci est le fruit de tes multiples encouragements.

A mes frères et sœurs : Joséphine Nadine, Christelle Tatiana, Jean-Marc

Je vous dédie ce travail. Vos prières m'ont portées chaque jour durant ces années d'étude recevez ici l'aboutissement de vos accompagnements. Je vous aime.

A tous les membres de ma famille : Voici la reconnaissance de vos nombreuses prières et encouragements.

REMERCIEMENTS

Je remercie :

Le Mali, ma patrie d'adoption ; merci pour l'hospitalité et la leçon de savoir vivre en communauté que j'ai reçue ces années. Puisse l'Eternel Dieu Tout Puissant accorder la paix à cette belle terre et faire d'elle un territoire un et indivisible.

Mes maîtres : pour leur disponibilité et leurs enseignements.

La promotion DE GAULLE : Merci pour tout votre soutien. Born to Win !

Mes camarades de la VIème promotion de Pharmacie Ousmane DOUMBIA

Les Docteurs : Samba Adama SANGARE, ALLAYE TRAORE, NAMORI CAMARA, Dalil BONABE , Neilly TEFO, pour avoir été d'excellents apprenants et soutiens.

Tout le personnel du Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) de Bamako, je ne saurais combien vous dire merci pour votre accueil et votre apprentissage.

Mes camarades du LRM de Bamako : Dr Lassina DOUMBIA, Tony ZITTI, Serges Lem AHANOGBE, CISSE, Mme DIAKITE Doussou COULIBALY, Fatoumata O. MAIGA, Elisabeth SOGODOGO, Sonia DJOUBI, merci pour votre compréhension à mon égard.

A toi, cher : Docteur TCHAMO NGUIFO Leonel

A travers ces quelques mots je voudrais te dire sincèrement merci. Tu as été un soutien inconditionnel durant toutes ces années. Ta présence dans ma vie, ta rigueur dans les études m'ont aidé à m'accepter, m'améliorer et à m'ouvrir aux autres. Je n'oublierai jamais tes encouragements et tes nombreux conseils. Le Seigneur Dieu seul connaît l'avenir, qu'il exhausse nos prières et que sa volonté soit faite. Amen.

A tous ceux que j'aurais omis et dont les prières ont conduits à la finalité de ce travail, ceci est votre récompense.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre maître et président du jury

Professeur Flabou BOUGOUDOGO, Pharmacien microbiologiste

- Maître de Conférences Agrégé de bactériologie et virologie à la faculté de pharmacie ;
- Responsable de l'enseignement de la bactériologie et de la virologie à la faculté de pharmacie
- Ancien Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP)
- Chevalier de l'ordre de mérite de la santé

Cher maître, vous nous avez fait l'immense honneur de présider le jury de cet exercice de thèse, soyez-en remercié.

Enseignant de renommée internationale, vos qualités scientifiques et humaines, ainsi que vos apports et suggestions ont sans aucun doute rehaussés grandement la qualité de ce travail.

Votre simplicité et votre disponibilité font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Soyez assuré, cher maître de notre disponibilité et de notre profonde gratitude.

A notre maître et juge

Docteur Ibréhima GUINDO

- Pharmacien biologiste
- Responsable du laboratoire des IST/VIH de l'INRSP

Cher maître, nous avons été très honoré de vous compter comme juge de ce travail.

Vos qualités en tant que Directeur scientifique, ont énormément rehaussé la valeur scientifique de ce document.

Nous vous réitérons notre profond respect et vous remercions de votre immense disponibilité.

A notre maître et juge

Professeur KAYA Assétou SOUKHO

- Spécialiste en Médecine interne
- Spécialiste en endoscopie digestive
- Praticienne hospitalière au service de Médecine interne du CHU Point G
- Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine et Odontostomatologie (FMOS)

Cher maître, nous vous sommes très reconnaissantes d'avoir accepté de juger ce travail.

Votre disponibilité et votre accueil nous ont permis d'apprécier vos qualités scientifiques et humaines.

Chers maître, votre rigueur scientifique et l'amour pour l'excellence dans le travail font de vous un maître respecté.

Veillez agréer le témoignage de notre profond respect et de notre sincère admiration.

A notre maître et directeur de thèse

Professeur Souleymane DIALLO II, Pharmacien biologiste

- Maître de Conférences en Bactériologie à la faculté de pharmacie
- Colonel Major des services de santé des armées
- Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Bamako

Cher maître, nous vous remercions de nous avoir confié ce travail. Votre rigueur scientifique, votre compétence, font de vous un enseignant reconnu et respecté de tous. Nous avons beaucoup appris à vos côtés particulièrement la rigueur scientifique, l'esprit d'équipe et l'éthique. Nous nous engageons à rester fidèle à vos enseignements tout au long de notre vie. Veuillez trouver en ces quelques mots l'expression de notre profonde gratitude.

LISTE DES ABBREVIATIONS

- CGPpr : cocci à Gram positif en paire
CGPch : cocci à Gram positif en chainettes
BGP : bacille à Gram positif
BGN : bacille à Gram négatif
DCGN : diplocoque à Gram négatif
CoccoBGN : cocco bacille à Gram négatif
HGT : Hôpital Gabriel TOURE
HPG : Hôpital du Point G
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONG : Organisation non gouvernementale
DGE : Direction générale des élections
SIBI : suspicion d'infection bactérienne invasive
Hib : *Haemophilus influenzae* type b
S.P.S : poly anéthol sulfonate de sodium
BD : Becton Dickinson
CO₂ : dioxyde de carbone
B.P.S : bactérie pathogène spécifique
NaCl : chlorure de sodium
ADN : Acide désoxyribonucléique
CMI : concentration minimale inhibitrice
PLP : protéines de liaison aux pénicillines
SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline
SCN : Staphylocoques à coagulase négative
SNA : Staphylocoques non aureus
BMR : bactérie multi résistante
ATB : antibiotique
ATP : Adénoside triphosphate
LCR : liquide céphalorachidien
R : résistant
I : intermédiaire
S : sensible
CICM : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

MON : Mode opératoire normalisé

IST : Infection sexuellement transmissible

VIH : Virus de l'Immunodéficience humaine

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

CHU Point G : Centre Hospitalier Universitaire du Point G

FMOS : Faculté de Médecine et Odontostomatologie

SOMMAIRE

Liste des figures	ix
Liste des tableaux	X
Introduction	01
Objectifs	02
3. Généralités	
A. Généralités sur les septicémies	03
1. Définitions	03
2. Epidémiologie des septicémies	03
3. Physiopathologie des septicémies	04
B. Diagnostic d'une septicémie bactérienne	06
1. Intérêt	06
2. Hémoculture	06
C. La résistance bactérienne aux antibiotiques	14
1. Type de résistance	14
2. Evolution/Causes de la résistance	14
3. Supports de la résistance	14
4. Mécanismes de la résistance	15
5. Principaux germes isolés des hémocultures	15
4. Méthodologie	
4.1. Cadre d'étude	26
4.2. Type et période d'étude	27
4.3. Population d'étude	27
4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion	27
4.5. Echantillonnage	27
4.6. Variables mesurées	27

4.7. Méthodes	28
4.8. Test de sensibilité aux antibiotiques	38
4.9. Conservation des souches	44
4.10. Analyse des données	45
4.11. Aspects éthiques	45
5. Résultats	46
5.1. Résultats globaux	46
5.2. Résultats descriptifs	46
6. Discussion	61
6.1. Pratique de l'hémoculture	61
6.2. Fréquence des hémocultures positives	61
6.3. Identification et test de sensibilité	62
6.4. Fréquence des bactéries multi résistantes au LRM	63
6.5. Conservation des souches	64
7. Conclusion	65
8. Recommandations	66
9. Références bibliographiques	67
Résumé	70
Abstract	71
Annexes	72

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Ultra structure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif.....	21
Figure 2 : L'automate BacT/ALERT 3D	30
Figure 3 : Bouillons de culture : à droite :FA , à gauche :FN	31
Figure 4 : L'automate VITEK 2 compact.....	37

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition des hémocultures positives selon la provenance des prélèvements au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	46
Tableau II: Répartition des hémocultures positives prélèvements au LRM en fonction du sexe des patients de janvier 2013 à décembre 2013	47
Tableau III: Fréquence des hémocultures positives en fonction de la tranche d'âge au LRM de janvier 2012 à décembre 2013.....	48
Tableau IV: Fréquence des espèces bactériennes isolées des hémocultures positives au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	49
Tableau V: Répartition des espèces bactériennes isolées des hémocultures selon la provenance au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	50
Tableau VI: Fréquence des bactéries résistantes aux antibiotiques testés dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	51
Tableau VII: Sensibilité des germes isolés à l'Amoxicilline dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	51
Tableau VIII: Sensibilité des germes isolés à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	52
Tableau IX: Sensibilité des germes isolés à la Ticarcilline dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	53
Tableau X: Sensibilité des germes isolés à la Céfoxitine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	54
Tableau XI: Sensibilité des germes isolés à la Céfotaxime dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	55
Tableau XII: Sensibilité des germes isolés à la Ceftazidime dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	56
Tableau XIII: Sensibilité des germes isolés à l'Amikacine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	57
Tableau XIV: Sensibilité des germes isolés à la Gentamicine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	58

Tableau XV: Sensibilité des germes isolés à la Ciprofloxacine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.....	59
Tableau XVI: Répartition des bactéries multi résistantes isolées au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	59
Tableau XVII: Répartition des bactéries multi résistantes isolées en fonction de l'espèce bactérienne au LRM de janvier 2013 à décembre 2013	60

1. INTRODUCTION

L'hémoculture, examen capital en pathologie infectieuse, n'est pas toujours praticable dans bon nombre d'hôpitaux de pays à revenus faibles et le clinicien est souvent contraint de suspecter la bactérie causale afin de définir une attitude thérapeutique. En effet, rares sont les signes de certitude et le médecin raisonne plutôt par arguments de fréquence (1).

La connaissance des principales espèces bactériennes responsables de bactériémies et le profil de sensibilité aux antibiotiques permettent de donner une base objective à l'antibiothérapie probabiliste des infections (2).

De nombreux automates permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance des bactéries (CO₂, ion H⁺, variation du potentiel redox du milieu).

L'identification des bactéries à partir des hémocultures positives a eu un essor considérable et les tests de sensibilité aux antibiotiques permettent de corriger rapidement la prescription probabiliste. La réussite du traitement dépend alors du bon choix des antibiotiques qui sont cependant rendus inefficaces le plus souvent par les phénomènes de résistance bactérienne et même de multi résistances.

Les bactéries sont dites multi résistantes aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et / ou acquises, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique (3).

La maîtrise de la diffusion des Bactéries Multi Résistantes (BMR) aux antibiotiques est une priorité de santé publique. Les conséquences de leur diffusion sont cliniques, écologiques et financières. La lutte contre les BMR est axée sur le bon usage des antibiotiques (réduction de la pression de sélection) et la prévention de la transmission croisée. Elle repose en premier lieu sur l'application stricte des précautions standards quels que soient le patient et le soin mis en œuvre (3).

La fréquence des infections bactériennes, le mauvais usage des antibiotiques par la population, et les défis liés à la sensibilité de ces derniers nous ont amené à une étude de surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des germes responsables de bactériémies au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako au Mali.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général :

Mettre en place un système de surveillance des résistances aux antibiotiques des bactéries associées aux septicémies dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako

2.2. Objectifs spécifiques :

- Mettre en place les bonnes pratiques d'hémoculture.
- Déterminer la fréquence des hémocultures positives au LRM
- Identifier les principales bactéries pathogènes dans les hémocultures au LRM.
- Déterminer la fréquence des bactéries multi-résistances dans les hémocultures au LRM
- Constituer une souchothèque des bactéries multi résistantes en hémocultures au LRM

3. GENERALITES

A. Généralités sur les septicémies

1. Définitions

L'hémoculture est une technique de laboratoire dont le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence de microorganismes (bactéries et levures) pathogènes dans le sang et d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques (4).

Une bactériémie est la présence de bactéries pathogènes dans le sang.

Elle traduit le plus souvent une infection localisée, parfois une infection endo-vasculaire (Ex: infection sur cathéter, endocardite).

- La présence de bactéries non ou peu pathogènes (staphylocoques à coagulase négative, microcoques, corynébactéries...) dans les hémocultures peut résulter d'une contamination lors du prélèvement, de l'ensemencement du flacon, au laboratoire.
- pour ces micro-organismes il faut au moins 2 hémocultures positives au même micro organisme (antibiotype) et une suspicion clinique pour porter le diagnostic d'une bactériémie (5).

2. Epidémiologie des Septicémies

La résistance aux antimicrobiens est la conséquence inévitable de la prescription des antibiotiques. «Quelles que soient les infections que l'on traite, les bactéries qui font partie de notre flore normale sont toujours exposées à ces antibiotiques», affirme le Dr Hajo Grundmann, qui est à la tête du Département des Maladies infectieuses et d'Épidémiologie de l'Université de Groningen, et du Département de Bactériologie de l'Institut national de la Santé publique des Pays-Bas. «En survivant simplement à l'attaque des antibiotiques, elles développent des stratégies plus élaborées pour venir à bout des antibiotiques les plus sophistiqués et les plus modernes.»

Il n'existe pas de données mondiales relatives au nombre de cas, y compris mortels, d'infections bactériennes résistantes. D'après l'étude de 2008, il y a chaque année au moins 25 000 patients dans l'Union européenne à elle seule qui meurent d'une infection due à une bactérie multi résistante, et les coûts de santé supplémentaires et la perte de productivité dus à ces bactéries sont estimés à au moins 1,5 milliard d'euros.

Certaines des infections les plus résistantes sont causées par des *Acinetobacter* à Gram négatif et par certaines souches de *Klebsiella* et espèces de *Pseudomona*, selon le Dr Spellberg. Ces bactéries provoquent toutes sortes de maladies qui vont de la pneumonie contractée à l'hôpital aux infections abdominales, en passant par les infections hématologiques et celles des voies

urinaires dues aux cathéters; on voit même des cas de méningite chez des gens soumis à des actes médicaux au niveau de la tête et du rachis, par exemple des péridurales pendant le travail (3).

3. Physiopathologie d'une septicémie

Une septicémie se définit comme le **passage répété** de bactéries dans le sang, à partir d'un **foyer** tissulaire de multiplication microbienne. Ce foyer s'est constitué lors du passage de bactéries exogènes par une porte d'entrée muqueuse ou tégumentaire.

Au cours d'une septicémie, les bactéries régulièrement véhiculées par le sang peuvent aller ensemençer d'autres tissus, créant alors des **foyer secondaires ou métastases infectieuses** qui peuvent, à leur tour, ensemençer le sang circulant.

Les septicémies traduisent l'extension d'une infection tissulaire. L'entité pathologique infectieuse est constituée par le foyer initial et les foyers secondaires éventuels.

3.1. Contextes cliniques

La symptomatologie clinique des septicémies est dominée par la fièvre fréquemment accompagnée de frissons et sueurs ;

Le risque de choc septique, accident évolutif aigu redoutable, essentiellement dû aux toxines bactériennes, et pouvant être responsable de la mort en quelques heures.

3.2. Modèles physiopathologiques

Selon les localisations de la porte d'entrée et du foyer, on distingue trois schémas physiopathologiques principaux.

- **Les septicémies thrombophlébitiques**, la porte d'entrée est souvent tégumentaire (brèche cutanée traumatique ou chirurgicale, corps étranger). Le foyer se **constitue au voisinage de la porte d'entrée** et consiste en un coagulum de fibrine infiltré de cellules sanguines, immunitaires, et colonisé par les bactéries (thrombus infecté).

De ce thrombus se détachent irrégulièrement des fragments (**microembols septiques**) qui ensemençent massivement le sang. Les **métastases sont fréquentes** et intéressent surtout les tissus pulmonaires, nerveux, rénaux et le système réticulo-endothélial. L'aspect de la courbe thermique est irrégulier (**fièvre désarticulée**) et les germes en cause sont surtout les **Staphylocoques** et les **Streptocoques**.

- **Les septicémies à point de départ lymphatique** : la porte d'entrée est souvent digestive. Les bactéries pathogènes traversent la muqueuse intestinale et se multiplient notamment au niveau des ganglions mésentériques qui constituent le foyer. A partir de ces foyers mésentériques, quelques bactéries peuvent gagner le sang par le canal thoracique et

aller constituer des métastases notamment dans le tissu réticulo-endothélial. Cependant, le plus souvent, les bactéries restent dans les ganglions ou leur lyse libère de grandes quantités d'endotoxines qui passent dans le sang. Il s'ensuit des chocs endotoxiniques fréquents et une fièvre rythmée ou en plateaux de plus en plus élevés. Les bactéries impliquées sont souvent des bactéries dites intracellulaires, notamment des Salmonelles (fièvre typhoïde), les Brucelles (brucellose), etc.

- **Les endocardites** surviennent surtout en cas de lésions cardiaques préexistantes (valvulopathie par exemple) ou chez les porteurs de prothèse cardiaques ou vasculaires. A l'occasion d'une bactériémie (le plus souvent d'origine tégumentaire ou dentaire), quelques bactéries viennent coloniser un petit coagulum de fibrine infiltré de plaquettes au niveau de l'endocarde lésé ou de matériel étranger intra vasculaire. Ce coagulum colonisé par les bactéries augmente progressivement de taille par dépôt successif de fibrine, plaquettes et cellules sanguines et devient une végétation qui constitue le foyer de la septicémie. A partir de cette végétation, les bactéries ou/et les substances bactériennes sont relarguées dans le sang de façon quasi permanente. La fièvre est peu élevée, mais presque permanente. Les bactéries responsables sont fréquemment des Streptocoques. Les germes constituent au sein de la végétation des défenses naturelles, des micro-colonies peu accessibles aux antibiotiques. De plus, ces bactéries bien adaptées au milieu, sont parfois **défectives** (paroi absente ou anormale). De ce fait, elles peuvent être **résistantes aux antibiotiques** (notamment aux bêta-lactamines) et **difficilement cultivables**

3.3. Autre formes physiopathologiques

- **En milieu chirurgical**, en **pathologie digestive** ou obstétricale, les septicémies peuvent revêtir des aspects particuliers dus à des inoculums massifs et poly microbiens.
- **Chez le nouveau-né**, la contamination se fait lors de la naissance ou plus rarement par voie placentaire. Les germes fréquemment en causes sont ***Escherichia coli K1***, **Streptocoques du groupe B**, ***Listeria***. **Les signes cliniques** sont particuliers : fièvre ou hypothermie, détresse respiratoire.
- **Chez l'immunodéprimé**, les germes en cause sont très variables selon le type d'immunodépression. Il s'agit souvent de germes opportunistes : Champignons, ***Pseudomonas***, Mycobactéries etc. Les signes cliniques et les réponses aux traitements sont modifiés par l'immunodépression.

- **Chez les porteurs de dispositifs médicaux implantables** (cathéters vasculaires, sondes, prothèses, etc.), les germes en cause sont souvent des *Staphylococcus aureus* ou non aureus producteurs de <<slime>>.

B. Diagnostic biologique d'une septicémie bactérienne

1. Intérêt

Le laboratoire de bactériologie intervient dans le **diagnostic** étiologique des septicémies, la **recherche du foyer**, le choix d'un **traitement et la surveillance** de son efficacité.

Un traitement probabiliste est en général débuté dès que les prélèvements bactériologiques sont effectués.

La recherche du foyer et de la porte d'entrée est un temps essentiel puisque la vraie maladie n'est pas la présence de bactéries dans le sang mais l'existence d'un foyer qu'il faudra stériliser pour guérir le malade. Les recherches bactériologiques sont, là encore, prépondérantes. En particulier, il faudra cultiver tout matériel étranger enlevé (sonde, cathéter) et faire des examens cyto bactériologiques de divers prélèvements (suppurations, biopsies, pièces chirurgicales, etc.) et des portes d'entrée possibles (urines, plaies, etc.).

La surveillance de l'évolution est à la fois clinique et biologique. Les meilleurs signes d'amélioration sous traitement sont :

- La disparition de la fièvre
- La négativation des hémocultures
- La stérilisation du ou des foyers

2. L'hémoculture

Principe

Le diagnostic étiologique d'une septicémie est assuré par **l'hémoculture**.

Devant un tableau clinique de septicémie, 1 à 3 hémocultures sont pratiquées en quelques heures. Le sang est un milieu stérile et la présence d'une bactérie quelle qu'elle soit est toujours anormale. **L'hémoculture est un examen très performant**. Il est sensible (on détecte, en théorie, une seule bactérie viable dans l'échantillon examiné) mais il faut se souvenir que 15% environ des hémocultures positives ont été **contaminées lors du prélèvement**.

Au cours des septicémies, le **nombre de bactéries dans le sang est souvent très faible**. Une quantité assez importante de sang doit donc être mise en culture si on veut avoir une chance qu'elle contienne au moins une bactérie.

Au cours des septicémies, la présence de bactéries dans le sang est **intermittente**. Il est donc nécessaire :

- De réaliser plusieurs prélèvements
- De les prélever lors des épisodes bactériémiques (fièvres, frissons).

Le sang contient des **facteurs limitant la croissance bactérienne** (phagocytose, complément, lysozyme, anticorps, parfois antibiotiques). Il est nécessaire de diminuer leur activité en diluant le prélèvement dans une grande quantité de milieu de culture (6).

Méthodes d'hémoculture L'hémoculture a deux techniques : une technique de diagnostic et une technique thérapeutique.

2.1. Méthode 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 à 36,5° C, doit faire rechercher un état septicémique.

2.2. Méthode 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.

2.3. Paramètres :

Afin de diminuer ce risque de faux positifs et d'identifier avec certitude la ou les bactéries incriminées, certains paramètres techniques sont à prendre en compte

- Paramètres pré-analytiques :

Ils sont essentiels pour rendre des résultats de qualité

Prélèvement sanguin

- **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 inexplicés, 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.

- **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, 10 ml 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 2 ml de sang. Chez l'enfant, 2 à 5 ml de sang peuvent suffire.

- **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 (6). La flore cutanée et environnementale est rendue responsable des contaminations.

L'interprétation des résultats devient alors problématique.

· Modes 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 Veinotube 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.

· Désinfection cutanée

Si les recommandations de l'OMS sont précises en matière de ponction veineuse, un accent particulier est mis sur l'antisepsie pour l'hémoculture.

L'antisepsie de choix est la teinture d'iode qui est bactéricide.

Pour des sujets présentant une allergie connue à l'iode, l'utilisation du Chlorehexidine alcoolique est recommandée. Le choix peut-être aussi porté sur la Bétadine dermique ou à défaut l'alcool iodé.

La peau de la zone de prélèvement ainsi que les doigts du préleveur doivent recevoir deux applications d'antiseptique espacées de deux à trois minutes (7).

- Paramètres analytiques :

Différents facteurs influent sur la positivité d'une hémoculture.

- Faible densité bactérienne :

Les bactéries sont le plus souvent en simple transit passif dans le sang. Le nombre de bactéries mis en culture, est alors faible et souvent de l'ordre d'une bactérie/ml. Il est donc nécessaire d'ensemencer plusieurs ml de sang dans divers flacons et à plusieurs reprises pour majorer les chances de positivité d'une hémoculture.

Les répétitions des cultures permettent de :

- diminuer les chances de manquer une bactériémie transitoire.
- confirmer le rôle pathogène d'isollements "saprophytes" tel que *Staphylococcus epidermidis*, si l'on les retrouve dans plusieurs prélèvements veineux.

Le volume de sang prélevé est la variable la plus importante. Plusieurs études révèlent une relation directe entre le volume de sang et le rendement de la technique. Le volume permet une augmentation significative du rendement technique :

- Pour un prélèvement de 20 ml à 40 ml : + 10% de positivité
- Pour un prélèvement de 40 ml à 60 ml : + 19% de positivité

Une augmentation de volume entraîne une augmentation de la sensibilité.

- **Vitalité bactérienne:**

L'activation des différents mécanismes de défense de l'organisme, suite à une bactériémie, affecte la vitalité des corps bactériens captés lors du prélèvement. Plusieurs éventualités se présentent :

- Les corps bactériens sont intacts : ils sont soit libres dans le plasma en phase de multiplication ou bien ils correspondent à des bactéries au repos.
- Les corps bactériens lésés ou masqués du fait du système immunitaire ou l'effet des antibiotiques.
- Les corps bactériens sous forme "L" : correspondent à des bactéries déficientes nutritionnelles.

La faible densité bactérienne, l'état lésé des corps bactériens, la phagocytose, expliquent que la mise en évidence de la positivité d'une hémoculture est très souvent retardée dans le temps par rapport à la rapidité d'obtention des cultures de repiquage au laboratoire.

- **Milieux de l'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.

a. Choix du bouillon

Le bouillon pour hémoculture doit favoriser la croissance des bactéries cliniquement importantes.

Plusieurs bouillons sont utilisés :

- bouillon cœur- cervelle ;
- bouillon trypticase –soja ;

- milieu au thioglycolate pour les anaérobies.

Un accent est mis sur la quantité de bouillon à ensemer. L'O.M.S (Organisation mondiale de la santé) recommande de mélanger le sang avec dix fois son volume de bouillon soit pour 5 ml de sang un équivalent de 50 ml de bouillon.

- **Facteurs de croissance**

Certaines bactéries telles que les Streptocoques déficients responsables de certaines endocardites ont des besoins spécifiques pour leur croissance. Aussi, les bouillons doivent être enrichis d'additifs ; ces facteurs sont le plus souvent présents dans le sang du prélèvement.

Quel que soit le milieu, plusieurs additifs sont proposés.

- Atmosphère

La plupart des milieux commercialisés ont une atmosphère enrichie en CO₂ et en Azote (N₂). L'enrichissement en oxygène pour les germes aérobies se fait au moment du prélèvement.

- Anticoagulant

Outre son rôle d'inhibition de la coagulation sanguine, il vise aussi à neutraliser les effets antibactériens du sérum et des phagocytes.

Une concentration à 0,025% limite son effet inhibiteur sur la croissance des *Neisseria* et des *Peptostreptococcus*.

L'anticoagulant habituellement utilisé est le S.P.S : Poly anéthol Sulfonate de Sodium. D'autres anticoagulants tels que le citrate, l'héparine sont aussi utilisés.

- Saccharose

Une concentration de 10 à 15% de saccharose éviterait la lyse des bactéries à paroi déficiente. Son efficacité n'est cependant pas encore démontrée.

- Molécules à groupement « thiol » ou « pyridoxal »

Elles favorisent la croissance des *bactéroides* et de certains Streptocoques déficients. Le groupement thiol neutralise un certain nombre d'antibiotiques, notamment les aminosides.

- Facteurs de croissance

L'hémine, la vitamine K3, favorisent le développement des bactéries exigeantes et des anaérobies.

- Inhibiteurs d'antibactériens

La pénicillinase inactive les bêta-lactamines en occurrence aux pénicillines.

L'acide para-amino-benzoïque neutralise les sulfamides.

Si divers milieux sont proposés, leurs compositions sont le plus souvent l'objet de protection industrielle.

b. Flacons d'hémoculture

- Constitution des flacons : De très nombreux milieux sont présentés par les fabricants en flacons sous pression réduite, permettant l'ensemencement direct à travers un opercule de caoutchouc. Ils contiennent le bouillon nécessaire pour la primo culture 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 (7).

2.4. Identification des germes :

Dès réception au laboratoire les flacons doivent être incubés à 35-37°C et inspectés régulièrement. La durée d'observation varie de 1 à 7 jours, lorsqu'il s'agit de la détection automatisée.

Devant une croissance définie par l'automate, le flacon est sorti, ouvert aseptiquement après désinfection de l'opercule de caoutchouc et une petite quantité de bouillon est prélevée à l'aide d'une anse stérile ou d'une aiguille stérile adaptée à l'usage. Un frottis coloré par la méthode de Gram permet de repérer la présence des germes.

Le résultat de la coloration de Gram est communiqué au médecin prescripteur ainsi qu'il suit :

(Par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...)

Un examen microscopique est complété par des repiquages sur milieux solides.

Repiquage et isolement - Identification

La réalisation des repiquages se fait en ensemençant en stries le contenu d'une anse ou une goutte de bouillon prélevée à l'aiguille, sur des milieux solides appropriés.

L'identification du germe se fera selon l'aspect des colonies sur des milieux différents de repiquage. A cet effet, au Laboratoire Rodolphe Mérieux les milieux utilisés pour la réalisation de subcultures à partir des flacons d'hémoculture sont :

- la gélose chocolat Poly vitex ; (milieu sur lequel toutes les bactéries se développent)
- la gélose au sang frais (gélose COS) ;
- la gélose Drygalski (sélective pour les bacilles à Gram négatif) ;

Dans des conditions où les risques de souillure sont élevés, il est possible de procéder à des subcultures à « l'aveugle »

- **Détection automatisée**

Divers automates (BACTEC 9050 chez BD, Bio Argos, BacT/ALERT 3D chez Bio Mérieux, Organon Technica) permettent aujourd'hui de détecter des hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés par la croissance des bactéries (CO₂, ion H⁺, variation du potentiel redox du milieu). Ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats. La qualité des milieux utilisés permet l'isolement de bactéries autrefois rarement découvertes dans des hémocultures (*Haemophilus*, *Campylobacter*). Ces automates sont cependant onéreux et ne sont utilisés que par les laboratoires pratiquant un nombre important d'hémocultures (6).

- **Résultats - Interprétation :**

Les résultats d'une hémoculture peuvent revêtir deux aspects :

• **Résultats négatifs**

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 sang ensemencé,
- . Milieux ou conditions de cultures inappropriées,
- . 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 asepsie 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.

- **Résultats positifs**

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

Schématiquement, on peut distinguer deux 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 est 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 poly microbiennes 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 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

C. La résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne est supportée par deux mécanismes distincts : les mutations génétiques *de novo* et les transferts d'éléments génétiques mobiles.

1. Types de résistance

- Résistance naturelle :

Certaines souches sont naturellement résistantes à certains antibiotiques (ex. : *Listeria monocytogenes* ou entérocoque aux Céphalosporines de troisième génération, anaérobies aux aminosides, bacilles à Gram négatif aux Glycopeptides...)

- Résistance acquise :

Souches qui en condition naturelle (= sauvages) sont sensibles à l'antibiotique mais qui ont acquis des mécanismes de résistance à cet antibiotique (ex. : *Streptococcus pneumoniae* et Pénicillines ou Macrolides, entérobactéries et β -lactamines, *Staphylococcus aureus* et Pénicillines...).

2. Evolution/causes de la résistance

Elle dépend : de la pression de sélection exercée par les antibiotiques des caractéristiques des différents antibiotiques (pharmacocinétiques, pharmacodynamiques) et de chaque couple antibiotique/bactérie (support, modalités et fréquence de la résistance) de la capacité de certaines espèces à accepter des gènes de résistance provenant d'autres espèces, favorisée de plus par les colonisations/infections pluri-microbiennes au sein d'un même site/hôte de la possibilité de la transmission interhumaine.

La sélection de bactéries résistantes est un effet inéluctable de l'utilisation des antibiotiques.

Sélection *in vivo* de bactéries résistantes sous traitement antibiotique dans le foyer infectieux

Modification des flores commensales avec acquisition de bactéries résistantes en dehors du foyer infectieux. D'où l'importance d'une politique de "bon usage des antibiotiques" : acte thérapeutique concluant une procédure diagnostique par un clinicien, ayant pour but la guérison d'une infection tout en ayant une efficacité optimale, une bonne tolérance, des conséquences écologiques minimales et un coût acceptable par la société.

3. Supports de la résistance

Chromosomique = liée à une mutation sur le chromosome bactérienne s'exerce que vis-à-vis d'un seul antibiotique en général non transférable d'une espèce bactérienne à l'autre concerne surtout les Quinolones, les Rifamycines, la Fosfomycine, l'Acide fusidique avec un taux de mutation élevé.

Extra-chromosomique : le plus fréquent, le plus souvent plasmidique pouvant porter plusieurs résistances à la fois transmissibles entre différentes bactéries de la même espèce, voire entre espèces différentes.

4. Mécanismes de la résistance :

Dépendent de :

- Inactivation enzymatique de l'antibiotique (ex. pénicillinases).
- Modification de la cible (ex. modification de la protéine de liaison aux pénicillines pour *S. pneumoniae* et *S. aureus*).
- Diminution de la perméabilité membranaire.
- Augmentation des mécanismes d'efflux (4)

5. Principaux germes isolés des hémocultures

Il convient tout d'abord de distinguer les bactériémies vraies des contaminations.

Si les bactériémies vraies sont le plus souvent mono microbiennes, une hémoculture positive poly microbienne (associée à certaines espèces) oriente plutôt vers une contamination du prélèvement. *Bacillus*, *Corynebacterium* et *Propionibacterium*, bactéries de la flore cutanéomuqueuse, sont des contaminants dans plus de 95% des cas. Les staphylocoques à coagulase négative (85% de contaminants), les entérocoques (20% de contaminants), et les streptocoques du groupe viridans (60% de contaminants) peuvent cependant, dans un certain nombre de cas, être responsables de bactériémies vraies : la distinction vrai/ faux positif pourra se faire en répétant les hémocultures chez le malade et surtout en tenant compte de la clinique.

5.1. Cocci à Gram Positif :

- Streptocoques
- Définition :

La famille des **Streptococcaceae** regroupe les genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, et *Lactococcus*, rassemblant des cocci à Gram positif souvent **disposés en chainettes**, dépourvus de catalase, Aéro-anaérobies et à métabolisme fermentatif.

- Classification :

La première classification était basée sur l'aspect de l'hémolyse entourant les colonies de Streptocoques sur gélose au sang. On distinguait ainsi :

- Les Streptocoques **béta-hémolytiques** : lyse complète des hématies avec destruction complète des stromas globulaires autour des colonies ;

- Les Streptocoques **alpha-hémolytiques** : lyse incomplète, zone plus petite à bords irréguliers avec souvent un reflet verdâtre du milieu de culture (Streptocoques dits viridans) ;
- Les Streptocoques non hémolytiques

Une des classifications des Streptocoques est basée sur des critères immunologiques (**classification de Lancefield**). La plupart des Streptocoques possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques variables permettent de définir des groupes sérologiques. Cette classification distingue 18 groupes sérologiques (désignés de A à H et de K à T). Les Streptocoques dépourvus d'antigène polysaccharidique ne sont pas groupables par la méthode de Lancefield. Ils sont identifiés par leurs caractères culturels et par leurs caractères biochimiques. Les études des homologies entre les ADN ont permis d'individualiser des groupes génomiques et de reconnaître de nouvelles espèces. Néanmoins, en pratique, les souches sont identifiées par l'étude de leurs caractères phénotypiques.

- *Streptococcus pneumoniae* :

A l'examen microscopique *S. pneumoniae* apparaît formé de cocci à Gram positif, souvent en diplocoques ovoïdes ou lancéolés opposés par leur pointe, formant un 8 et entourés par une large capsule. Parfois ils peuvent se présenter en courtes chainettes. La capsule est mieux visible après préparation à l'encre de Chine.

C'est une bactérie très fragile, sensible au froid et à la dessiccation et qui s'autolyse rapidement en culture. Aéro-anaérobie, sa culture sur milieux riches (gélose au sang) doit être faite à 37° C, sans délai après le prélèvement.

Sur gélose au sang, après 24 heures d'incubation, les colonies sont petites (goutte de rosée), entourées d'une zone d'hémolyse alpha, verdâtre. *S. pneumoniae* se distingue des autres *Streptococcus* par sa sensibilité à l'Optochine et par la lyse que produisent les sels biliaries sur une culture en bouillon.

- Sensibilité aux antibiotiques
 - Sensibilité diminuée aux bêta-lactamines

Les souches de *S. pneumoniae* sont naturellement sensibles aux bêta-lactamines, notamment à la pénicilline G et à l'Amoxicilline avec des CMI inférieure à 0,06 mg/l. Néanmoins la proportion des souches de sensibilité intermédiaire (I) à la Pénicilline (CMI comprise entre 0,1 et 1 mg/l) et celle des souches résistantes (R) à la Pénicilline (CMI supérieur à 1mg/l) ne cesse de croître.

La détection d'une souche résistante à la pénicilline doit conduire à la détermination de la CMI des autres béta- lactamines car il existe des résistances croisées à des niveaux variables. Le Céfotaxime et l'Imipenème restent généralement actifs. Les souches résistantes appartiennent préférentiellement aux sérotypes 23F, 6, 19 et 14.

- Autres familles d'antibiotiques

Environ 50% des souches sont résistantes aux Macrolides mais restent sensibles aux Synergistines. Plus de 30% des souches résistent à la Tétracycline, 25% au Chloramphénicol et 40% au Cotrimoxazole. Seuls les Glycopeptides sont constamment actifs.

Il existe une résistance naturelle aux Aminosides, à l'Acide fusidique, aux Polymyxines et à la plupart des Quinolones (6).

• Genre *Staphylococcus* :

- Définition

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des **Micrococcaceae** qui regroupe des espèces bactériennes constituées de cellules arrondies (cocci) à Gram positif, immobiles, disposées en **amas**, à la façon d'une grappe de raisin.

Les staphylocoques produisent une catalase, ce qui les distingue des Streptocoques et des Entérocoques. Ils sont Aéro-anaérobies et poussent facilement sur milieu ordinaire (6).

- Classification

L'opposition entre (*Staphylococcus doré* pathogène) et (Staphylocoque blanc non pathogène) est historique et insuffisante car elle ne correspond pas à la réalité. On distingue aujourd'hui : L'espèce *Staphylococcus aureus*. Elle produit une coagulase (enzyme capable de coaguler le plasma de lapin oxalaté). Elle est très souvent responsable d'infections pyogènes graves. C'est aussi une espèce saprophyte ou commensale, isolée de prélèvements sur la peau ou les muqueuses ou sa présence est normale.

a) *Staphylococcus aureus* :

Cette espèce est l'une des bactéries la plus souvent isolées au laboratoire de bactériologie médicale. Après culture de 24 heures sur gélose nutritive, *S. aureus* donne des colonies produisant en général un pigment doré. Il pousse et fermente le mannitol sur milieu de Chapman, faisant virer le rouge de phénol au jaune. Ce milieu contient une concentration de 7,5% de NaCl qui inhibe la plupart des autres germes. Ce qui caractérise le mieux l'espèce *aureus* c'est la production d'une staphylo-coagulase, enzyme facile à mettre en évidence au laboratoire (1). *Staphylococcus aureus* se présente sous forme de Cocci arrondis, immobiles,

soit isolés, soit regroupés en courtes chainettes ou en amas dans le pus ou les éléments sont tantôt libres tantôt phagocytés (6).

Comme les autres Staphylocoques, *Staphylococcus aureus* est présent dans l'environnement (air, sol, aliments, mobilier, et matériels). Vit fréquemment à l'état commensal sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux (8).

- Sensibilité aux antibiotiques :

- Les bêta-lactamines :

La pénicilline G est très active sur les souches de *S. aureus* non productrices de pénicillinase, mais ces souches sont rares aujourd'hui (inférieur à 10%). Les souches productrices d'une pénicillinase redeviennent sensibles à l'Amoxicilline en présence d'Acide clavulanique. Les Pénicillines semi-synthétiques du groupe M (méthicilline et oxacilline) ne sont pas détruites par la pénicillinase de *S. aureus*. Ce sont d'excellents antibiotiques anti-staphylococciques. De 10 à 50% des souches de *S. aureus* isolées dans les hôpitaux français résistent à la Méthicilline et à l'Oxacilline. Ce pourcentage varie selon les services. Ces souches sont désignées comme Staphylocoque Aureus Résistant à la Méthicilline (SARM) ou encore comme souches (**méthi R**). Cette résistance est aussi qualifiée d'«homogène». En effet, pour certaines souches, seulement une partie de la population bactérienne est capable *in vitro*, dans des conditions techniques précises, d'exprimer sa résistance. Les travaux cliniques ont montré que **toutes les Pénicillines et toutes les Céphalosporines sont actives sur les souches Résistantes à la méthicilline.**

- Les Glycopeptides :

La Vancomycine et la Téricoplanine sont des antibiotiques de recours pour traiter les septicémies et les endocardites dues à des souches de *S. aureus* multi résistantes. Leurs indications sont limitées aux infections mettant en jeu le pronostic vital et pour lesquelles aucune autre antibiothérapie n'est efficace. L'émergence de mutants résistants au cours de monothérapies par la Vancomycine a été signalée depuis 1997.

Ces souches de moindre sensibilité aux Glycopeptides sont désignées comme GISA : *Glycopeptides Intermediate Staphylococcus aureus*.

- Autres familles d'antibiotiques :

Les souches résistantes à la Méthicilline sont habituellement résistantes à de nombreux autres antibiotiques, notamment aux Aminosides et aux Fluoroquinolones. Parmi les Macrolides, l'Erythromycine a une activité inconstante. Le traitement des infections graves à *S. aureus* ne peut se faire sans une étude approfondie au laboratoire de la sensibilité de la souche, en

réserve à l'usage local. Elle est principalement utilisée pour éradiquer le portage nasal de *S. aureus* (6).

b) autres Staphylocoques :

Les **Staphylocoques autres** que *Staphylococcus aureus* sont souvent identifiés aux espèces non productrices de coagulase et sont connus comme "Staphylocoques à coagulase négative" (SCN). Leur identification se faisant par opposition à *Staphylococcus aureus*, d'où le terme de "*Staphylococcus non aureus* " (SNA) serait cependant préférable. Ce sont les principaux commensaux de la peau mais ils sont également isolés des muqueuses. La densité de colonisation est plus importante au niveau des régions situées à proximité des orifices ou les zones humides comme la partie antérieure des narines, le périnée, les creux axillaires et les plis inguinaux (9).

5.2. Cocci à Gram négatif :

- Généralités sur les **Neisseriaceae**

Le genre *Neisseria* de la famille des *Neisseriaceae* rassemble des cocci à Gram négatif, groupés par deux en diplocoques opposés par leur face plane, immobiles, **possédant une oxydase**, une catalase et **aérobies stricts**.

Deux espèces du genre *Neisseria*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, sont habituellement pathogènes pour l'homme. Elles exigent pour leur culture des milieux riches et une température de 37°C. Elles ne dénitrifient ni les nitrates, ni les nitrites.

Les autres espèces de *Neisseria* sont peu exigeantes pour leur croissance. Elles poussent sur gélose ordinaire, réduisent les nitrates ou les nitrites et n'ont qu'un pouvoir pathogène occasionnel. Elles peuvent parfois être responsables de pneumopathies ou de méningites.

Les *Neisseria* ne sont jamais rencontrées comme saprophytes dans l'environnement, elles sont soit pathogènes, soit commensales des muqueuses de l'homme et des animaux.

- *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis est une bactérie **spécifique de l'homme** et dont l'habitat est le **rhinopharynx**. Sa transmission interhumaine se fait par voie aérienne par les gouttelettes de Pflugge (salive) sur une distance n'excédant pas un mètre. La transmission est associée à une exposition proche et répétée.

- **Les infections bactériennes** à *Neisseria meningitidis* représentent environ 20% des cas. Elles ont encore un pronostic redoutable malgré l'antibiothérapie (létalité : 30%). La méningococcie fulminante se manifeste par un purpura extensif et souvent nécrotique associé à un état de choc sévère et à une coagulopathie de consommation.

En matière de méningococcies, il y a une relation nette entre la létalité et le délai d'institution du traitement. La mortalité reste lourde, de 8 à 10% des cas. Aussi, toute suspicion du diagnostic impose une **hospitalisation en urgence**.

D'autres formes cliniques sont rarement observées : endocardites, péricardites, conjonctivites, otites, arthrites, infections broncho-pulmonaires (6).

5.3. Bacilles à Gram positif

Les bacilles dits "Gram positif" sont les bacilles répondant positivement au test de Gram. Le test de Gram vise à déterminer la nature des bactéries en cause et non la gravité de l'infection. Une infection par un bacille Gram positif n'est en soi ni plus grave ni moins grave qu'une infection par des bacilles Gram négatifs. Le test de Gram permet d'ajuster les traitements antibiotiques. Il existe plusieurs types principaux de bacilles Gram positifs, entre autres nous pouvons citer :

Listeria monocytogenes (provoquant la listériose.) et *Corynebacterium spp.*

- *Listeria monocytogenes* :

Ce sont de petits bacilles ubiquitaires, que l'on trouve dans le sol sur les plantes, et dans les eaux (saprophytes). *L.monocytogenes* est une bactérie opportuniste responsable par diffusion hématogène de trois types d'infections chez l'homme :

- Listeriose de l'adulte et de l'enfant : méningites, méningo-encéphalites, encéphalites, septicémie. La grande majorité de ces infections se produisent chez des malades porteurs de tares viscérales (cirrhose, cancers, etc...). La listériose de l'adulte atteint essentiellement les personnes âgées et immunodéprimées.
- *Listériose de la femme enceinte* : infection bénigne pour la femme, se traduisant souvent par une simple fièvre mais grave pour le fœtus, pouvant provoquer un avortement, la mort in utero ou l'accouchement prématuré.
- *Listériose néonatale* : septicémie, méningite secondaires à la contamination dans les jours qui précèdent l'accouchement ou au moment de l'accouchement (10).

5.4. Bacilles à Gram Négatif

Les bactéries à Gram négatif sont mises en évidence par une technique de coloration appelée coloration de Gram. Les bactéries à Gram négatif apparaissent alors rosées au microscope. La technique de coloration repose sur les caractéristiques membranaires et de paroi de la bactérie.

La coloration de Gram est un facteur déterminant dans la taxonomie (classification) bactérienne.

Les bactéries à Gram négatif ont une structure qui s'organise en trois grandes parties, soit, de l'extérieur vers l'intérieur :

- La membrane externe,
 - L'espace péri plasmique, comportant notamment la paroi,
 - La membrane plasmique.
- Enterobacteriaceae :

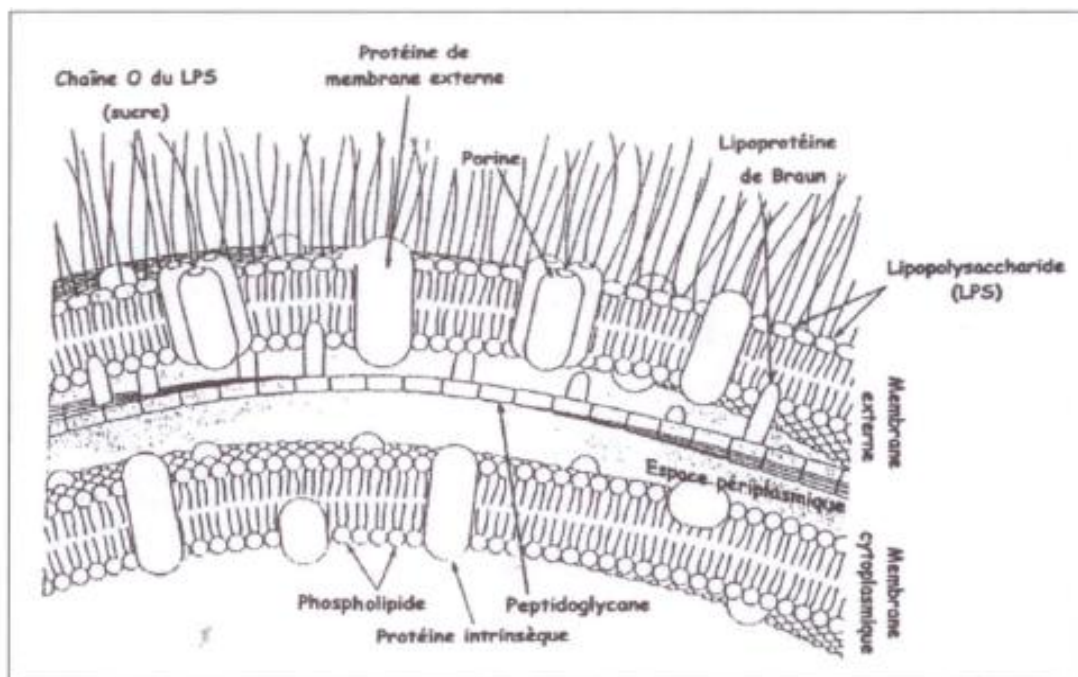


Figure 1 : Ultra structure de la paroi des bactéries à Gram négatif (source : (6))

Les Enterobacteriaceae ou entérobactéries sont une vaste famille de bactéries qui sont rencontrées tous les jours en bactériologie médicale. Elles sont nommées ainsi parce que la plupart des espèces qui composent cette famille sont des hôtes, soit normaux, soit pathogènes, du tube digestif de l'homme et des animaux.

En fait la famille des Enterobacteriaceae est définie par des caractères bactériologiques et non par des caractères écologiques. Les Enterobacteriaceae sont des bacilles à Gram négatif qui :

- s'ils sont mobiles, sont péritriches (cils disposés tout autour du corps bactérien) ;
- poussent sur milieux ordinaires ;
- poussent en aérobie et en anaérobie ;

- réduisent les nitrates en nitrites ;
- ont une réaction d'oxydase négative ;
- utilisent le glucose par voie fermentative.

Cette définition permet d'exclure de la famille des Enterobacteriaceae d'autres bacilles à Gram négatif, par exemple les *Pseudomonas*, les *Vibrio* et les *Aeromonas*.

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres : Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie. Ce sont :

- *Escherichia*, *Shigella*.
- *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter*.
- *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.
- *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (groupe KES « VP + »), *Hafnia*.
- *Yersinia*, *Edwardsiella*.

D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme.

Ce sont :

Buttiauxella, *Cedecea*, *Ewingella*, *Kluyvera*, *Koserella*, *Leclercia*, *Leminorella*,
Moellerella, *Obesumbacterium*, *Rhanella*, *Tatumella*, *Trabulsiella*,
Xenorhabdus, *Yokenella*.

L'identification des entérobactéries se fait d'abord par l'étude des caractères biochimiques. Mais au sein d'une même espèce, la variabilité de certains caractères permet de différencier les souches entre elles et de déterminer des biotypes.

L'étude des différents antigènes, qui intervient après celle des caractères biochimiques, permet de classer en sérotypes les souches appartenant à une même espèce ou à un même genre.

La détermination des sérotypes a un grand intérêt épidémiologique pour certaines entérobactéries pathogènes : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (6).

- Les entérobactéries opportunistes

Ce sont des Enterobacteriaceae commensales du tube digestif de l'homme. A l'occasion d'un affaiblissement des défenses immunitaires ou de techniques de soin, de réanimation particulièrement, ces bactéries peuvent coloniser différents sites anatomiques et y développer une infection.

- Enterobacter

Les Enterobacter sont des bacilles à Gram négatif, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae dont ils ont tous les caractères. Les espèces du genre Enterobacter sont généralement mobiles, fermentent ou non le lactose. Ils ont une béta-galactosidase et donnent une réaction de Voges-Proskauer (VP) positive. La classification des Enterobacter a été l'objet de nombreux remaniements.

A coté de *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, les plus souvent rencontrés, on distingue les espèces suivantes : *E. amnigenus*, *E. asburiae*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *E. hormaechei*, *E. sakazakii*. L'espèce *E. hafnia* constitue aujourd'hui le genre Hafnia. *E. agglomerans* est classée comme *Pantoea agglomerans*.

Les Céphalosporines de troisième génération semblent favoriser l'émergence des souches multi résistantes d'Enterobacter.

Enterobacter cloacae et *Enterobacter aerogenes*, les plus souvent isolés, sont responsables d'infections urinaires, de suppurations diverses, de bactériémies. *Enterobacter sakazakii* a été responsable de petites épidémies de méningites néonatales.

Le pouvoir pathogène des autres espèces doit être précisé.

- Sensibilité aux antibiotiques

Les Enterobacter, notamment *Enterobacter cloacae*, sont souvent résistants à de nombreux antibiotiques et le traitement doit être guidé par des tests de laboratoire. Il est important au cours d'une infection par *Enterobacter cloacae* de surveiller attentivement l'efficacité d'un traitement par de nouvelles béta-lactamines. En effet, cette espèce peut devenir résistante au cours du traitement, soit par diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne, soit par une hyperproduction d'une Céphalosporinase (6).

- Autres Bacilles Gram Négatifs

- *Haemophilus influenzae* type b (Hib) :

C'est un bacille à Gram négatif immobile de petite taille (0,5 – 2,5), agent supposé de la grippe (*influenza*) reçoit le nom générique d'*Haemophilus* car il exige pour sa croissance des milieux enrichis au sang et une atmosphère enrichie en CO₂ : *Haemophilus influenzae* type b (Hib) est un hôte exclusif des muqueuses de l'homme principalement au niveau des voies aériennes supérieures >> (11).

Sensibilité aux antibiotiques : Jusqu'en 1974, l'ampicilline était le traitement de choix des méningites à *H. influenzae*. Depuis cette date on connaît des souches hébergeant un plasmide codant pour une **béta-lactamase** qui hydrolyse la Pénicilline G et l'Ampicilline, mais qui est inactive sur les Céphalosporinées. Cette production de béta-lactamase concerne 15 à 25% des

souches non capsulées isolées en pathologie respiratoire chez l'adulte. Cette situation fait utiliser d'emblée une **Céphalosporine de troisième génération** pour traiter les infections invasives. La résistance des souches varie en fonction de la nature du prélèvement, globalement, elle concerne pour la tétracycline 10% des souches, le Chloramphénicol 3%, la Kanamycine 25% et le Cotimoxazole 10%. Toutes les souches sont sensibles aux Fluoroquinolones (6).

- *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa ou Bacille pyocyanique est un commensal du tube digestif, mais peu abondant chez le sujet sain, occasionne de nombreuses infections chez le sujet fragilisé. *Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif, il est très mobile grâce à une ciliature polaire en général mono triche (12).

Sensibilité aux antibiotiques : *P. aeruginosa* est une bactérie généralement **multi résistante**. Les antibiotiques pouvant avoir une bonne activité sont : la Ticarcilline, la Pipéracilline, l'Azlocilline, la Ceftazidime ; la Cefsulodine, le Céfépime, l'Imipénème et les Aminosides. Les souches résistantes à la Colistine sont très rares. La Ciprofloxacine est la plus active des Quinolones. L'activité de tous ces antibiotiques n'est pas régulière et doit toujours être précisée par l'antibiogramme (6).

Les bactéries anaérobies strictes

- Définition

Les bactéries anaérobies strictes sont dépourvues des enzymes du métabolisme respiratoire et doivent produire leur énergie par fermentation. En fonction de leur comportement vis-à-vis de l'oxygène on peut distinguer les EOS et les anaérobies stricts.

- Les EOS (extremely oxygen-sensitive)

Ces bactéries ne tolèrent aucun contact avec l'oxygène et meurent immédiatement dans une atmosphère qui en contient.

- Les anaérobies strictes

Pour ces bactéries l'oxygène est toxique, mais à un degré moindre que pour les EOS. Pour se développer elles nécessitent une atmosphère dépourvue d'oxygène. Les anaérobies ayant un intérêt médical appartiennent à cette catégorie.

- Classification

Il est habituel de distinguer deux grands groupes d'anaérobies stricts :

- Les anaérobies telluriques :

Bacilles à Gram positif sporulés du genre *Clostridium*. La spore, forme de résistance, permet leur survie en milieu hostile, sur le sol. Ils sont aussi commensaux de l'intestin. Leur pouvoir pathogène est dû à la production de toxines.

- Les anaérobies non telluriques ou flore de <<Veillon>> :

Ces bactéries non sporulées sont commensales des cavités naturelles de l'homme. Elles n'élaborent pas de toxine et sont pathogènes par leur pouvoir de multiplication

- Sensibilité des bactéries anaérobies aux antibiotiques
 - La Pénicilline G est très active sur de nombreuses espèces anaérobies, dont *Clostridium perfringens*. Mais les Pénicillines sont souvent inactives sur *Bacteroides fragilis*, qui produit une bêta-lactamase inhibant aussi les Céphalosporines et parfois les Céphamycines (Céfotétan). Les associations bêta-lactamines+Inhibiteurs de bêta-lactamases et les Carbapénèmes ont une bonne activité sur l'ensemble des anaérobies strictes.
 - Les Aminosides (Gentamicine, Amikacine, etc.) sont inactifs vis-à-vis de tous les anaérobies.

4. METHODOLOGIE

4.1. Cadre d'étude

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (C.I.C.M) a constitué notre cadre d'étude. Le CICM est situé dans le quartier de l'ex- base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux.

Fruit de la collaboration entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux, le CICM a été mis en place suite à la signature de l'Accord- cadre N° 0956/1899 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la Convention du 16 janvier 2005 et son Protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère de la Santé et la Fondation Mérieux.

- 8 décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali
- 15 janvier 2004 : Pose de la première pierre du CICM
- 17 janvier 2005 : Inauguration du CICM
- 2 mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM comprend :

- une administration générale.
- un centre de formation avec une formation diplômante le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée), des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage
- un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de routine.

La présente étude s'est déroulée dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Le CICM a pour mission de participer tout comme les autres structures du Ministère de la Santé au développement sanitaire du Mali par le service rendu aux malades, la formation, la recherche et le renforcement des capacités dans le domaine du diagnostic biologique dans des conditions désintéressées au bénéfice de la population.

Les ressources humaines du CICM sont composées de 28 agents (voire organigramme en annexe 1) répartis entre les services techniques du LRM (18 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (10 agents).

Le LRM se compose des Laboratoires 1 et 2 au sein desquels les activités de recherche et de diagnostic de routine sont effectuées. Le Laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la

réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie et le Laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie).

4.2. Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude transversale, prospective, descriptive qui s'est déroulée de janvier 2013 à décembre 2013.

4.3. Population d'étude

Notre étude a porté sur les prélèvements effectués chez les patients hospitalisés ou non adressés au LRM pour hémoculture.

4.4. Critères d'inclusion et de non inclusion

- **Critère d'inclusion**
 - Tout prélèvement effectué chez un patient hospitalisé ou en ambulatoire dont la température corporelle était $\geq 38,5^{\circ}$ C au moment de la ponction veineuse et adressé au LRM.
- **Critères de non inclusion**
 - Prélèvement incorrect.
 - Tout prélèvement sanguin reçu 1 heure après la ponction.

4.5. Echantillonnage : Nous avons effectué un échantillonnage exhaustif de toutes les hémocultures du LRM pendant la période d'étude.

4.6. Variables mesurées :

- Mode opératoire écrit
- Age des patients
- Sexe des patients
- Provenance des prélèvements
- Espèce bactérienne isolée
- Résistance aux antibiotiques
- Multi-résistance bactérienne aux antibiotiques

4.7. Méthodes

4.7.1. Collecte des données

Les données ont été extraites du logiciel SYSLAM (CODATEC informatic, France). Certains renseignements cliniques ont été obtenus à partir des fiches d'examens fournis par le médecin traitant. Le système CODAT informatique est un progiciel de gestion du management de laboratoire, dans le cadre de l'accréditation ISO 15189. CODAT intègre la gestion du contrôle de qualité en partenariat avec la société MELOS. **Un dispositif de navigation** inédit apporte une grande facilité et un **gain de temps** conséquent dans la manipulation des dossiers.

En effet, il est aisé de passer depuis l'accueil d'un dossier à son état d'avancement, à des modifications éventuelles, à la validation, aux archives ou à sa gestion financière par simple transit inter programmes.

En outre, des icônes permettent également d'accéder à d'autres programmes en multissession avec la possibilité de retour instantané au travail en cours.

4.7.2. Techniques de laboratoire

4.7.2.1. Rédaction des procédures et formation du personnel

Dans le cadre de la démarche qualité, et pour une bonne traçabilité, nous avons procédé à la rédaction et à la mise à jour des modes opératoires normalisés (MON) de l'hémoculture au LRM. Nous avons écrit ces modes opératoires sous la supervision du directeur du laboratoire qui les a ensuite validés. Le personnel pratiquant a été formé à l'exécution de ces MON.

4.7.2.2. L'hémoculture

▪ Réception des prélèvements

Les prélèvements reçus au laboratoire sont tout d'abord saisis sur support informatique au niveau de la réception. Ensuite ils sont acheminés au laboratoire, où ils sont inscrits dans un registre de laboratoire. Ce dernier comprend :

- Une partie des renseignements sur le patient (numéro de laboratoire, nom et prénom, âge, sexe, résidence, origine...)
- Types de flacons utilisés (Flacon aérobie, Flacon anaérobie, Flacon pédiatrique)
- Résultats de la coloration de Gram
- Nom(s) du ou des germes isolés
- Le type de carte utilisée pour l'antibiogramme
- Observation(s) du biologiste

▪ Introduction des flacons dans l'automate

Après réception des flacons au niveau de la paillasse de bactériologie et enregistrement dans le registre, ils sont immédiatement acheminés et introduits dans l'automate (BacT/ALERT 3D). (Voir annexe n°2)

Quotidiennement, le personnel surveille l'évolution ou non de la courbe de croissance bactérienne, via le voyant tactile de l'automate.

Tout flacon pour lequel l'on n'observe pas de croissance de la courbe bactérienne est déclaré négatif au bout de sept (7) jours d'incubation. Il est signalé par la présence du chiffre 1, dans la case qui porte le **signe moins(-)**.

Tandis que, tout flacon pour lequel une croissance bactérienne est détectée par l'automate est déclaré positif. Il est signalé par la présence du chiffre 1, dans la case qui porte le **signe plus(+)**.

a. Appréciation de la technique au laboratoire

- Présentation des méthodes

▪ L'appareil BacT/ALERT 3D et les bouillons de culture

Le système « BacT/ALERT 3D Combination » fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bio Mérieux, la croissance des micro-organismes 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 (13).

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

Tout comme le système BacT/ALERT 3D combination, l'appareil « BACTEC 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md. » et d'autres automates d'hémoculture utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Un volume de sang est prélevé, en fonction de l'âge 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)

Les micro-organismes présents dans les bouteilles BACTEC libèrent du CO₂ qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO₂ libérée par les micro-organismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités préprogrammés (14).



Figure 2 : Automate BacT/ALERT 3D (source : LRM du CICM)

- Les bouillons de culture

Plusieurs types de flacons existent pour l'usage de l'automate BacT/ALERT 3D. Chacun d'entre eux a une composition précise :

BacT/ALERT iFA (aérobies)

30 ml de bouillon complexe supplémenté et du charbon activé. Réf. 251062

BacT/ALERT iFN (anaérobies)

40 ml de bouillon complexe supplémenté sous atmosphère N₂ et CO₂ et du charbon activé.
Réf. 251063

BacT/ALERT iFA PLUS (aérobies)

30 ml de bouillon complexe, supplémenté et billes polymériques absorbantes. Réf. 412990

BacT/ALERT iFN PLUS (anaérobies)

40 ml de bouillon complexe supplémenté sous atmosphère N₂ et CO₂ et billes polymériques absorbantes. Réf. 412991



Figure 3: Bouillons de culture : à droite : FA, à gauche : FN (source : LRM du CICM)

b. Protocole des hémocultures négatives

Au bout de sept (7) jours d'incubation, si aucune croissance bactérienne n'est signalée, retirer le flacon de l'automate selon la procédure établie. (Voir annexe n°2)

Noter dans le registre la date de sortie et conclure que la culture est négative, rendre le résultat finale comme étant stérile.

c. Protocole des techniques des hémocultures positives

Les procédures suivantes sont suivies lorsque le BacT/ALERT 3D indique que l'hémoculture est positive :

– le flacon est retiré de l'appareil BacT/ALERT 3D. Sa capsule en plastique est désinfectée avec de l'alcool à 70°C, ensuite une aiguille de subculture est insérée à travers la capsule et

immédiatement après préparer une lame pour la coloration de Gram (voir annexe n°3) ainsi qu'une subculture de l'échantillon de sang en utilisant les milieux suivants selon le cas :

- a. milieu de gélose au sang frais (gélose COS) ou au sang de cheval ou de mouton ;
- b. milieu de gélose Drygalski ;
- c. milieu de gélose chocolat poly vitex ;

Sont écrits sur chaque boîte le numéro CODAT attribué au patient lors de l'enregistrement de l'échantillon à la réception ainsi que la nature du prélèvement ; reporter tous les résultats sur la fiche de travail.

– nous procédons à la lecture de la coloration de Gram :

a. si aucun micro- organisme n'est détecté sur la lame de coloration, remettre le flacon dans l'automate. Ceci devrait être fait le plus tôt possible dans les 3 heures maximums qui suivent la sortie du flacon. Dans les 3 heures, une goutte du bouillon doit être mise en subculture sur les différentes boîtes de géloses citées plus haut. Les boîtes et le flacon sont incubés et observés pendant une durée de 7 jours (à compter de l'incubation du flacon). Le flacon n'est plus mis en subculture si au bout de ces 7 jours aucun micro-organisme n'a toujours pas été identifié.

b. quand des micro-organismes sont détectés, ne plus remettre le flacon dans le BacT/ALERT 3D. Reporter sur la fiche de travail les résultats de la coloration de Gram (par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, CoccoBGN, DCGN, Levures...) ;

– le médecin pratiquant est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram ;

– lorsque des Cocci à Gram positif en paires ou en chainettes sont observés, placer un disque de Bacitracine (A) et un disque d'Optochine (P) sur la gélose au sang de la subculture ;

– les boîtes contenant les subcultures sont placées dans l'incubateur à CO₂.

Si la coloration de Gram est positive, le flacon est incubé avec les boîtes ;

– lorsqu'une croissance est observée, reporter sur la fiche de travail les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées. Faire une coloration de Gram sur ces colonies et reporter les résultats sur la fiche de travail. S'il existe plusieurs types de colonies, l'aspect de chaque colonie bactérienne est aussi reporté ;

– dans les cas où des Cocci à Gram positif sont observés, se référer à l'organigramme de travail comme suit :

a. enregistrer les résultats des tests des disques d'Optochine et de Bacitracine ainsi que le test de la catalase ;

- b. si le micro-organisme est catalase-positif et ressemble au Staphylocoque (Cocci à Gram positif en grappes), faire un test de coagulase. Si le micro-organisme est coagulase-positif, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus aureus*. Si le micro-organisme est coagulase négative après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *Staphylococcus* à coagulase négative;
- c. lorsque le micro-organisme est catalase négative, beta-hémolytique, et Bacitracine-positif (inhibé par la Bacitracine), enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* Groupe A ;
- d. au cas où le test à la Bacitracine ou à la catalase est flou, faire un PYR test. Si le PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* groupe A ;
- e. dans le cas où le micro-organisme est catalase négatif, beta-hémolytique, et Bacitracine négatif, faire les tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* beta-hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;
- f. quand le micro-organisme est catalase négative, Optochine positif (inhibé par le disque d'Optochine) et diplocoque à Gram positif, l'enregistrer comme étant *Streptococcus pneumoniae*. Si le test d'optochine est négatif ou non concluant, faire un test de «bile solubility». Si ce test de solubilité par la bile est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus pneumoniae* ;
- g. lorsque le micro-organisme ressemble au *Streptococcus* (catalase négative, cocci à Gram positif en chaînette), mais négatif au test du disque d'optochine et négatif au test de solubilité par la bile, effectuer le PYR test.
- h. au cas où le résultat du PYR test est positif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Enterococcus* species. Si le résultat du PYR test est négatif, enregistrer le micro-organisme comme étant *Streptococcus* alpha ou gamma hémolytique selon la réaction d'hémolyse ;
- quand le micro-organisme est un bacille à Gram positif, aucun test additionnel n'est effectué, enregistrer seulement «Bacille à Gram Positif» ;
 - lorsque des bactéries à Gram négatif sont observées, la référence est faite à l'organigramme ainsi qu'il suit :
- a. si le micro-organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Drygalski faire un test d'oxydase et inoculer une galerie API 20 E. Les Enterobacteriaceae (tels que *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*) sont oxydase négatifs ; les *Vibrio* et les *Pseudomonas* sont oxydase positive. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *Salmonella*, *Shigella* ou

Vibrio, confirmer le résultat par un test de sérotypage. Enregistrer le résultat de ces différents tests ;

b. lorsque le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang frais et sur la gélose chocolat PolyViteX[®] mais ne pousse pas sur la gélose Drygalski et est diplocoque à Gram négatif, *Neisseria meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, le confirmer par un test de sérotypage ;

c. quand le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang frais et sur la gélose chocolat poly vitex mais pas sur la gélose Drygalski et se présente comme de petits bacilles à Gram négatif, nous pouvons suspecter *Haemophilus influenzae*.

Faire un test d'oxydase et un test des facteurs X et V. Dans le cas où l'identification indique *Haemophilus influenzae*, le confirmer par un test de sérotypage ;

– nous procédons à un antibiogramme par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby-Bauer ;

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

d) Méthodes d'identification des bactéries

- **Coloration de Gram** : (voir annexe n°3)

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 à Gram positif en grappes = Staphylocoques

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

Cocci à Gram positif en chaînettes = Streptocoques.

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

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

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

Bacilles à Gram positif : égale plusieurs micro-organismes

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

Lactobacillus, *Propionibacterium*.

Cocci à Gram négatif en paires = *Neisseria*

Note : Les cocci à Gram négatif les plus connus sont arrangés en pair

(Diplocoques) et attachés par leur côté. Ils ressemblent à des grains de café.

Bacilles à Gram négatif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles à Gram négatif comprenant *Haemophilus*,

Escherichia, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio* sont des bacilles courts et minces ; les bactéries entériques (*Escherichia*, *Klebsiella* ; *Salmonella*)

Shigella) sont plus longues, plus épaisses et sont mieux colorées aux extrémités qu'au centre.

- **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 :

Beta-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 du sang.

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 observée autour des colonies.

Parmi les exemples de bactéries Beta-hémolytique on retient les Streptocoques du Groupe A et B, le *Staphylococcus aureus* ainsi que *Escherichia coli*.

Parmi les exemples de bactéries Alpha-hémolytique 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*.

- Test de la Catalase :

Principe :

Le test de la catalase est un examen important pour identifier les microorganismes, en particulier les bactéries à 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). L'enzyme de 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 se produisent.

Matériels et réactifs utilisés :

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

Procédure : (voir annexe n°4)

Le test de la catalase est plus 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 à l'Optochine (disque P)

Principe :

Le test à l'Optochine est une procédure simple utilisée pour l'identification de *Streptococcus pneumoniae*. Le disque d'Optochine (P) contient l'éthylhydrocupréine qui inhibe la croissance de *Streptococcus pneumoniae*. Avant l'exécution du test, il convient de confirmer la ressemblance du micro-organisme à *Streptococcus pneumoniae*, c'est-à-dire diplocoques Gram-positif qui apparaissent allongés et attachés à leurs bouts. Les colonies sont alpha-hémolytiques, et peuvent apparaître aussi bien sèches que muqueuses.

Matériels et réactifs utilisés :

Disque d'Optochine (P)

Gélose au sang

Anse

Procédure : (Voir annexe n°7)

Interprétation :

Réaction positive = Inhibition de croissance autour du disque d'Optochine. La zone d'inhibition devrait être supérieure ou égale à 15 mm.

Réaction négative = Zone d'inhibition autour du disque d'Optochine de moins de 15 mm (c'est-à-dire entre 6 et 15 mm).

Un résultat positif est indicatif de *Streptococcus pneumoniae*.

Une réaction négative n'exclut pas *Streptococcus pneumoniae* ainsi toutes réactions négatives devraient être confirmées par un test de <<bile solubility>>. Si le test d'Optochine et celui de <<bile solubility>> sont tous les deux négatifs, le microorganisme identifié n'est pas *Streptococcus pneumoniae*. Si l'un ou l'autre des tests est positif, le micro-organisme est identifié comme étant *Streptococcus pneumoniae*.

Toute fois, la méthode automatisée nous permet également d'identifier les germes lorsque la méthode classique présente des limites ou ne donne pas de résultats suffisamment clairs. Il suffit de préparer dans un tube à hémolyse une suspension bactérienne à 0,5 Mc Ferland, et de se servir de la carte VITEK pour identification correspondant à la nature du germe étudié. Ensuite introduire la cassette portant la carte dans l'automate (VITEK 2 compact).

(Voir annexe n°8)

Il existe de nombreuses cartes VITEK pour identification, parmi lesquelles :

- Streptocoques et entérocoques : ID : AST -GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
- GN : ID : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117
- GP: ID: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233
- LEVURES : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-Y501, réf 22108



Figure 4 : L'automate VITEK 2 compact (source : LRM du CICM)

1 — Capot de remplissage. Donne accès au module de remplissage.

2 — Capot d'accès utilisateur avant. Donne accès à l'optique, à l'incubateur et à une partie du système de transport de carte.

3 — Capot d'accès utilisateur supérieur. Uniquement opérationnel si le capot d'accès utilisateur avant est ouvert ; il permet d'accéder au système optique et au carrousel. Ce capot s'ouvre par l'avant et reste en position ouverte jusqu'à ce que l'utilisateur le referme.

4 — Capot de chargement. Donne accès à l'aire de chargement/déchargement de la cassette. Un mécanisme de verrouillage en interdit l'ouverture lorsque l'instrument est en cours de fonctionnement.

5 — Capot du collecteur de déchets. Donne accès au récipient collecteur de déchets, à partir duquel les cartes éjectées sont retirées de l'instrument. Le capot est maintenu en place par un système magnétique et s'ouvre à partir de la droite.

4.8. Test de Sensibilité aux antibiotiques :

4.8.1. Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby- Bauer

Ce procédé définit l'utilisation de la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques in vitro selon Kirby- Bauer pour tester la sensibilité, d'importants isolats en clinique. Les résultats de cet examen peuvent aider les médecins dans la sélection de l'antibiotique approprié pour la thérapie.

- Principe :

La méthode de diffusion des disques selon Kirby- Bauer est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion de l'antibiotique du disque et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du micro-organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus micro-organisme est sensible).

Le test doit être exécuté exactement comme décrit sinon les résultats ne seront pas précis.

- Matériels et réactifs utilisés :

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

Milieu de culture pour *Haemophilus* (HTM)

Solution saline stérile à 0,85 %

Standard 0,5 de Mc Ferland

Disques antibiotiques pour test de sensibilité

Ecouvillons en coton stériles

Pipettes à sérum

Pinces à disques et/ ou applicateur de disque

- Conditions de stockage nécessaires :

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

- Procédure du test :

1. Les boîtes de gélose doivent être réchauffées à la température de la salle ou à l'étuve avant qu'elles ne soient inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais des gouttelettes d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le microorganisme;

2. La gélose HTM (gélose spéciale) est utilisée pour les tests *Haemophilus*.

La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour tous les autres tests ;

3. Enlever du réfrigérateur les disques pour le test de sensibilité afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle. Au paravent ils auront été enlevés du récipient de conservation. Il ne faut pas exposer les disques froids à l'air de la salle parce que la condensation de l'humidité sur les disques froids conduirait à une détérioration rapide des antibiotiques. Vérifier les dates d'expiration sur les boîtes d'antibiotiques.

Ne pas utiliser de disques périmés ;

4. Sélectionner au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang. Toucher le sommet de chaque colonie avec une anse et les transférer dans un tube de solution saline. Ajuster l'inoculum de la solution saline à une turbidité égale à un standard de

0,5 de l'échelle de Mac Ferland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté;

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

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

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

Utiliser souvent des applicateurs de disques d'antibiotiques ;

8. Les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

Pour *Streptococcus pneumoniae* : Oxacilline 5 µg (pour le test de Pénicilline 10UI), Ceftriaxone 30µg, Erythromycine 15µg, Chloramphenicol 30µg ;

Pour *Staphylococcus aureus*: Pénicilline 10 UI, Oxacilline 1µg, Ceftriaxone 30µg ;

Pour *Haemophilus influenzae*: Ampicilline 10µg, Ceftriaxone 30µg, Chloramphénicol 30µg ;

Pour les autres bacilles à Gram négatif

Boîte de gélose N°1- Ampicilline 10µg, Ceftriaxone 30µg, Chloramphénicol 30µg.

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

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

Les espèces *Streptococcus* et *Haemophilus* sont placées dans l'incubateur à CO₂ tous les autres micro-organismes devraient être placés dans un incubateur en aérobiose.

- Interprétation :

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

2. Mesurer les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte.

Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins.

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

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

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

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

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

- Compte-rendu :

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

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

3. Quelques résultats avec les tests des disques de diffusion pourraient être irréalisables.

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

Reporter comme résistants tous les tests de *Salmonella* et *Shigella* avec des Aminoglycosides et les Céphalosporines de première et seconde génération.

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

4.8.2. L'antibiogramme à partir de l'automate VITEK 2 compact

Ce procédé définit l'utilisation de cartes près à l'emploi, qui servent à la réalisation de l'antibiogramme. En effet, les cartes sont constituées de 36 puits et permettent de tester près de dix-huit antibiotiques appartenant à différentes familles. Les résultats de cette méthode, hautement fiable, peuvent guider le praticien dans le choix d'une antibiothérapie de qualité efficace.

- Principe :

Le système VITEK 2 compact est destiné à l'identification des bactéries et des levures ; ainsi qu'à la réalisation d'antibiogramme pour les bactéries significatives sur le plan clinique. Le système comprend l'instrument VITEK 2 compact, un ordinateur, une imprimante. Le logiciel fourni avec le système VITEK 2 compact inclut des programmes d'analyse et de gestion des données. Une interface informatique bidirectionnelle transfère automatiquement les résultats vers le système d'information de laboratoire de l'utilisateur (LIS) et vers divers rapports de produits et de patients.

Procédure : (voir annexe n°8)

- Interprétation :

1. Tous les tests de sensibilité sont lus après 20 à 24 heures d'incubation. Si les examens sont lus plus tôt ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis.
2. L'automate rend les résultats de l'antibiogramme lui-même, en précisant si le germe est sensible ; intermédiaire ou résistant à tel ou tel autre antibiotique.
3. En cas de multi résistance, la confirmation qu'il s'agit d'une Béta-Lactamase à Spectre Elargi (BLSE) est faite par l'appareil même ou par la méthode de recherche d'un bouchon de champagne sur gélose Muller-Hinton.

4.8.3. L'antibiogramme à partir de l'automate mini Api

Ce procédé définit l'utilisation des galeries classiques, qui permettent la réalisation de l'antibiogramme des bactéries non fermentaires. C'est une technique qui est de plus en plus délaissée au profit de l'utilisation de l'automate VITEK 2 compact.

- Principe :

Principe de fonctionnement : Le Mini API permet deux types de lecture.

- La lecture turbinéphéléométrique

Elle est destinée aux galeries turbinéphéléométrique.

Exemple : ID 32 GN

ID 32 C

ATB UR

Turbidimétrie : est la mesure de l'intensité de la lumière transmise (T) inversement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Néphélométrie : est la mesure de l'intensité de la lumière diffusée (D) à 30°C directement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Ces deux mesures permettent d'évaluer la densité bactérienne dans chaque cupule.

Le cycle d'une lecture turbidimétrique se fait en deux étapes :

1ère étape :

Entrée du chariot porte galerie et détection du code de la galerie

2ème étape :

Mesure sous la position sans filtre puis sortie du chariot porte galerie

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

- La lecture colorimétrique

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

Exemple: ID 32 STAPH

ID 32 E

Rapid ID 32 A

Rapid ID 32 STREP

Le Mini API effectue pour chaque cupule une mesure de transmission de la lumière dans 4 régions du spectre visible.

Le cycle d'une lecture colorimétrique se fait en 4 étapes :

1ère étape :

- 1ère entrée du chariot porte galerie
- Détection du code de la galerie
- Mesure sous filtre K60

2ème étape :

- 1ère sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous filtre K40

3ème étape :

- 2ème entrée du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT bleu

4ème étape :

- 2ème sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT vert

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

- Procédure :

Le travail est fait sur des colonies jeunes, c'est-à-dire des colonies qui n'ont pas plus de 24 heures. La préparation de la suspension bactérienne à 0,5 Mc Ferland est faite à partir d'une suspension Médium API. Prélever 200 µl de la suspension et faire une dilution dans une solution d'ATB Médium, bien mélanger, ensuite distribuer 135 µl dans chaque puits de la galerie. Incuber pendant 24 heures. (Voir annexe n°9)

- Interprétation :

La lecture est faite après 24 heures. On note le profil bactériologique et on rend le résultat.

4.9. Conservation des souches :

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 micro-organismes 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.

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. (Voir annexe n°10)

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 84° C (15).

4.10. Analyse des données

Les fiches d'enquête utilisées nous ont permis de saisir les données via Microsoft Office Word 2007, de réaliser les figures et graphiques grâce au système Microsoft Office Excel 2007.

Après saisie, l'analyse des ces données a été faite par le processeur IBM SPSS statistics version 20. Pour Windows. Le test de Chi deux a permis de comparer des proportions et le seuil de signification a été fixé à 0,05.

4.11. Aspects éthiques :

Les hémocultures ont été effectuées en respectant les règles de bonnes pratiques de laboratoire.

L'anonymat et la confidentialité des patients ont été respectés conformément aux règles d'éthique médicale. En effet les noms et prénoms des patients n'ont été mentionnés dans aucun document permettant de faire le lien avec le résultat. .

Il n'y a pas de conflit d'intérêt dans cette étude.

5. RESULTATS

5.1. Résultats globaux

Au Total 9 procédures essentielles ont été écrites et validées au LRM.

Liste des procédures au CICM essentielles à la réalisation des hémocultures

- 01 : Mode opératoire de l'utilisation du BacT/ALERT 3D
- 02 : Mode opératoire de la technique de coloration de Gram
- 03 : Mode opératoire de la technique du test de la catalase
- 04 : Mode opératoire de la technique du test de l'oxydase
- 05 : Mode opératoire de la technique du test de coagulase
- 06 : Mode opératoire de la technique du test au disque d'Optochine
- 07 : Mode opératoire de l'utilisation du VITEK 2 compact
- 08 : Mode opératoire de l'utilisation du Mini API
- 09 : Mode opératoire réalisation des souches

Au total, 238 prélèvements de sang de patients ont été reçus pour une hémoculture au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako de janvier 2013 à décembre 2013. Parmi ces hémocultures 68 étaient positives soit une prévalence de 28,6%. Les hémocultures étaient contaminées dans 18,9% des cas.

5.2. Résultats descriptifs

Tableau I : Répartition des hémocultures positives selon la provenance des prélèvements de sang au LRM de janvier 2013 à décembre 2013

Provenance	Hémocultures		
	Positive	Négative	Total
Hospitalière	62 (36,7%)	107	169 (71%)
Communautaire	03 (27,3%)	08	11 (24,4%)
Non précisé	03	55	58
Total	68	170	238

$$X^2 = 5,46 ; \text{ddl} = 1 ; p = 0,025$$

La majorité des prélèvements était d'origine hospitalière (71%) et il y avait 4,6% des hémocultures qui étaient d'origine communautaire. Cependant 24,4% des prélèvements de

sang étaient d'origine inconnu. Les hémocultures d'origine hospitalière étaient positives à 36,7% et celles d'origine communautaire étaient de 27,7%. La différence est statistiquement significative ($p < 0,05$).

Tableau II : Répartition des hémocultures positives au LRM en fonction du sexe des patients de janvier 2013 à décembre 2013

Sexe	Hémocultures		
	Positive	Négative	Total
Masculin	39 (27,8%)	101 (72,2%)	140
Féminin	29 (29,9%)	68 (70,1%)	97

$$X^2 = 0,12 ; \text{ddl} = 1 ; p = 0,75$$

Le sex ratio des patients reçus pour hémocultures au LRM était de 1,4.

La différence des prélèvements de sang positifs au LRM dans les hémocultures n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$).

Tableau III : Fréquence des hémocultures positives en fonction de la tranche d'âge au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Tranches d'âge (en années)	Hémocultures		
	Positive	Négative	Total
0 à 10	04 (6,6%)	11	15
10 à 20	06 (10%)	12	18
20 à 30	16 (26,6%)	30	46
30 à 40	09 (15%)	21	30
40 à 50	06 (10%)	09	15
50 à 60	11 (18,3%)	08	19
60 et plus	08 (13,3%)	26	34
Total	60	117	177

$$X^2 = 5,07 ; \text{ddl} = 8 ; p = 0,75$$

NB : Chez huit (8) patients, l'âge n'était pas déterminé.

La majorité des hémocultures positives au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako de janvier 2012 à décembre 2013 étaient représentées dans la tranche d'âge de 20 à 30 ans, soit 26,6% de positivité. Les hémocultures négatives toutes tranches confondues représentaient 66,1%.

La différence entre les tranches d'âge des hémocultures positives au LRM n'était pas significative ($p=0,75$)

Tableau IV : Fréquence des espèces bactériennes isolées des hémocultures positives au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolées	Fréquences	Pourcentage
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	10	22,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	20,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	20,5
<i>Escherichia coli</i>	8	18,2
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	3	6,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	4,6
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	2,3
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,3
<i>Citrobacter</i>	1	2,3
Total	44	100

Au total nous avons isolé 44 bactéries des hémocultures.

Les espèces bactériennes majoritairement isolées étaient *Acinetobacter baumannii complex* (22,7%), *Staphylococcus aureus* (20,5%), *Klebsiella pneumoniae* (20,5%), *Escherichia coli* (18,2%). Nous avons observé des associations de bactéries telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii complex* ; *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* ; *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii complex*.

Tableau V : Répartition des espèces bactériennes isolées des hémocultures selon la provenance au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolées	Hospitalier	Communautaire	Total
<i>Staphylococcus aureus</i>	9 (100%)	0	9
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>complex</i>	9 (90%)	1 (10%)	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8 (88,9%)	1 (11,2%)	9
<i>Escherichia coli</i>	8 (100%)	0	8
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	3 (100%)	0	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (100%)	0	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (100%)	0	1
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (100%)	0	1
<i>Citrobacter</i>	1 (100%)	0	1
Total	42	2	44

La majorité des espèces bactériennes isolées dans les hémocultures au cours de cette étude provenaient du milieu hospitalier soit 95,5%. Les espèces bactériennes majoritairement isolées des hémocultures d'origine hospitalière étaient : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Acinetobacter baumannii complex*. Seulement 2 espèces avaient été isolées des hémocultures d'origine communautaire : *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii complex*.

Tableau VI : Fréquence de bactéries résistantes aux antibiotiques testés dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Antibiotiques	Résistance	Sensibilité	Total
Ticarcilline	28 (84,8%)	05 (15,2%)	33
Ceftazidime	27 (77,2%)	08 (22,8%)	35
Gentamicine	26 (68,4%)	12 (31,6%)	38
Ciprofloxacine	26 (78,8%)	7(21,2%)	33
Amoxicilline	16 (88,9%)	02 (11,1%)	18
Cefotaxime	15 (75%)	05 (25%)	20
Amoxicilline/Acide clavulanique	15 (68,2%)	07 (31,8%)	22
Amikacine	14 (40%)	21 (60%)	35
Céfoxitine	03 (12,5%)	21 (87,5%)	24

La plupart des espèces bactériennes isolées des hémocultures positives au LRM présentaient un phénomène de résistance aux antibiotiques testés. En effet, les antibiotiques tels que : l'Amoxicilline ; la Ticarcilline ; la Ceftazidime ; la Ciprofloxacine avaient les pourcentages les plus élevés de résistance observée.

Tableau VII: Sensibilité des bactéries isolées à l'Amoxicilline dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	8(100%)	8
<i>Escherichia coli</i>	2(28,57%)	6(71,43%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	0	3(100%)	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	4(100%)	4
Total	2	21	23

Toutes les bactéries isolées des hémocultures étaient résistantes à l'Amoxicilline à l'exception de *Escherichia coli* dont 2 souches sur 8 étaient sensibles.

Tableau VIII : Sensibilité des bactéries isolées à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique/Augmentin® dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (12,5%)	7(87,5%)	8
<i>Escherichia coli</i>	5(62,5%)	3(37,5%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	0	2(100%)	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (25%)	3 (75%)	4
<i>Citrobacter</i>	0	1(100%)	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2(100%)	2
Total	7	15	22

La majorité des espèces bactériennes présentaient une résistance élevée à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique dans notre étude. Cependant nous avons isolé quelques souches de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* sensibles à cette association.

Tableau IX : Sensibilité des bactéries isolées à la Ticarcilline dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2	2
<i>Escherichia coli</i>	2(25%)	6(75%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>complex</i>	3(37,5%)	5(62,5%)	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	4	4
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	5	28	33

Klebsiella pneumoniae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex* étaient les espèces de bactéries dont toutes les souches isolées étaient résistantes à la Ticarcilline. Quelques souches sensibles de *Escherichia Coli* et *Acinetobacter* à la Ticarcilline ont été isolées.

Tableau X : Sensibilité des bactéries isolées à la Céfoxitine des souches bactériennes isolées dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0	8
<i>Escherichia coli</i>	8	0	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>complex</i>	1	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	0	4
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	21	3	24

Deux espèces bactériennes *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex* étaient totalement résistantes à l'antibiotique Céfoxitine. Il n'y avait pas de résistance des autres espèces de bactéries isolées des hémocultures à la Céfoxitine.

Tableau XI : Sensibilité des bactéries isolées à la Céfotaxime dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
<i>Escherichia coli</i>	4 (50%)	4 (50%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>complex</i>	0	1	1
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	5	15	20

L'ensemble des espèces bactériennes isolées des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux présentaient une résistance à la Céfotaxime. *Acinetobacter baumannii complex*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex* présentaient une résistance totale (100%) à la Cefotaxime. Cependant quelques souches : *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* avaient également une sensibilité pour cet antibiotique.

Tableau XII : Sensibilité des bactéries isolées à la Ceftazidime dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2	2
<i>Escherichia coli</i>	4 (50%)	4 (50%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>complex</i>	2 (16,7%)	10(83,3%)	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (25%)	3 (75%)	4
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	8	27	35

Toutes les espèces bactériennes isolées des hémocultures au LRM présentaient une résistance à la Ceftazidime. En effet, les espèces bactériennes telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii complex*, *Staphylococcus aureus* avaient les pourcentages de résistance les plus élevés ; avec respectivement 83,3% ; 83,3% et 75%.

Tableau XIII : Sensibilité des bactéries isolées à l'Amikacine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (50%)	1 (50%)	2
<i>Escherichia coli</i>	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	6 (60%)	4 (40%)	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	3 (75%)	1 (25%)	4
<i>Citrobacter</i>	1	0	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	0	2
Total	21	14	35

La plus part des espèces bactériennes isolées des hémocultures au LRM présentaient une résistance à l'Amikacine. *Klebsiella pneumoniae* (62,5%) était l'espèce bactérienne qui présentait la résistance la plus élevée à l'Amikacine au LRM. Les espèces comme *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex* étaient sensibles.

Tableau XIV: Sensibilité des bactéries isolées à la Gentamicine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (12,5%)	7(87,5%)	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2	2
<i>Escherichia coli</i>	5 (62,5%)	3 (37,5%)	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4 (57,2%)	3 (42,8%)	7
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	2 (20%)	8 (80%)	10
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	12	26	38

Les espèces bactériennes suivantes ; *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex*, isolées des hémocultures positives au LRM étaient totalement (100%) résistantes à la Gentamicine.

Tableau XV: Sensibilité des bactéries isolées à la Ciprofloxacine dans les hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Sensible	Résistant	Total
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (12,5%)	7 (87,5%)	8
<i>Escherichia coli</i>	4 (50%)	4 (50%)	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> complex	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (25%)	3 (75%)	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	1
<i>Citrobacter</i>	0	1	1
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	0	2	2
Total	7	26	33

Toutes les espèces bactériennes isolées des hémocultures positives au LRM présentaient une résistance à la Ciprofloxacine. Ainsi, les espèces telles que : *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacae complex* présentaient une résistance totale à la Ciprofloxacine.

Tableau XVI : Répartition des bactéries multi-résistantes isolées des hémocultures au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

BMR	Effectif	Pourcentage
Oui	24	10,08
Non	214	89,92
Total	238	100

Au total, 24 espèces de bactéries multi-résistantes ont été isolées des hémocultures positives au LRM durant notre étude soit un 10,08%.

Tableau XVII : Répartition des bactéries multi résistantes isolées en fonction de l'espèce au LRM de janvier 2013 à décembre 2013.

Germes isolés	Effectif	Pourcentage
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	29,2%
<i>Escherichia coli</i>	4	16,7%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	8,3%
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	5	20,8%
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	12,5%
<i>Citrobacter</i>	1	4,2%
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	8,3%
Total	24	100

Les espèces de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques isolées des hémocultures positives étaient : *Klebsiella pneumoniae* (29,2%), *Acinetobacter baumannii complex* (20,8%), *Escherichia coli* (16,7%)

6. Discussion

L'objectif de ce travail était de mettre en place au LRM la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques dans le cadre des septicémies à Bamako. Pour cela nous avons adopté comme méthodologie d'écrire les modes opératoires normalisés nécessaires à la réalisation des hémocultures au LRM, d'isoler les bactéries et d'évaluer leur résistance aux antibiotiques pendant 24 mois. Nous avons choisi le LRM parce qu'il dispose d'un plateau technique adéquat pour la réalisation de ce travail.

6.1. Pratique de l'hémoculture

L'hémoculture est une technique de laboratoire dont le but est de mettre en évidence la présence ou l'absence de micro-organismes (bactéries et levures) dans le sang et d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques selon les cas (6). En effet, la fiabilité et la qualité de cet examen dépendent à la fois des bonnes conditions de prélèvement par le personnel soignant ; mais aussi des moyens mis en place pour l'isolement et l'identification des germes susceptibles de s'y retrouver. Les bonnes pratiques de laboratoire exigent la rédaction et la validation de tous les modes opératoires nécessaires à la réalisation de l'hémoculture. C'est ce que nous avons commencé par faire au LRM. Ensuite le personnel a été formé à l'application de ces modes opératoires. Ce qui a permis de générer des données de qualité dans le cadre de ce travail car le taux de contamination était faible 18,9%.

6.2. Fréquence des hémocultures positives

De nombreux automates étaient utilisés pour la détection des micro-organismes susceptibles de se développer dans le sang. Nous avons utilisé dans notre étude les services du BacT/ALERT 3D de chez bio Mérieux ; tandis que Koné. SM, s'était servie du BACTEC de chez BECTON DICKINSON (17). Au total, 238 prélèvements de sang pour examen d'hémoculture ont été reçus au Laboratoire Rodolphe Mérieux de janvier 2013 à décembre 2013. Les hémocultures positives au LRM étaient au nombre de 68, soit un pourcentage de positivité de 28,6%.

Au Centre national hospitalier et universitaire Hubert KOUTOUKOU Maga de Cotonou, Soude AM., avait un échantillon total de 361 prélèvements pour hémoculture à analyser. Cette étude avait rapportée 108 hémocultures positives, soit un taux de positivité de 29,9% (18). En effet, la fréquence des hémocultures positives observée dans ce travail se rapprochait de celle de Soude AM.

Un taux de positivité nettement inférieur 19,7% à celui de ce travail avait été retrouvé après 18 mois d'étude faite par Soraa, N. et coll., (19).

6.3. Identification et test de sensibilité

L'identification des espèces bactériennes isolées des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux avait été faite sur la base de leurs caractères morphologiques, culturels et biochimiques. En effet, la coloration de Gram et la culture sur gélose spécifique (gélose Drygalski, gélose au sang frais, gélose chocolat) nous avaient permis d'avoir une idée sur la nature de la bactérie isolée. L'identification des bactéries pathogènes au LRM dans les hémocultures positives de janvier 2013 à décembre 2013, avait été faite pour l'essentiel par les automates VITEK 2 compact et Mini API.

Toutefois, des tests d'identification rapide tels que le test à la catalase ; test à la coagulase ; test à l'Optochine, dont les modes opératoires normalisés décrits en annexes avaient été utilisés à cet effet.

Niandou. NT, avait utilisé la galerie classique API 20 E pour l'identification des entérobactéries dans les hémocultures ; mais aussi dans d'autres prélèvements tels que les urines, les pus, les prélèvements vaginaux, les liquides, la coproculture (24). Koné. SM avait également utilisée la galerie classique API 20 E pour l'identification des entérobactéries isolées des hémocultures (13).

L'étude de la sensibilité des espèces bactériennes isolées au LRM dans les hémocultures de janvier 2013 à décembre 2013, avait été faite pour l'essentiel par le biais des automates tels que : le VITEK 2 compact ; le Mini API.

Niandou. NT, avait utilisé la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur gélose Muller Hinton dans l'étude de la sensibilité des germes isolés des hémocultures (24).

6.4. Fréquence des bactéries multi résistantes au LRM

Au total, 24 espèces bactériennes multi résistantes avaient été isolées des hémocultures positives au LRM de janvier 2013 à décembre 2013. La fréquence des bactéries multi résistantes au LRM dans les hémocultures positives était de 10,08%. Les espèces bactériennes multi résistantes principalement isolées des hémocultures étaient ; *Klebsiella pneumoniae* (29,2%), *Acinetobacter baumannii complex* (20,8%), *Escherichia coli* (16,7%).

6.4.1. Fréquence de la résistance à l'Augmentin

La résistance à l'Augmentin des espèces bactériennes isolées au LRM de janvier 2013 à décembre 2013 était totale (100%) chez les espèces telles que *Acinetobacter baumannii complex*, *Citrobacter* et *Enterobacter cloacae complex*. Cependant, l'espèce *Klebsiella pneumoniae* (87,5%) et l'espèce *Escherichia coli* (37,5%); présentaient la fréquence de résistance à l'Augmentin la moins élevée.

Niandou. NT, avait obtenu respectivement 74% et 79% pour les espèces *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* résistantes à l'association Amoxicilline-Acide clavulanique.

6.4.2. Fréquence de la résistance à la Céfotaxime

Toutes les espèces bactériennes excepté *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la Céfotaxime. L'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* (87,5%) isolée des hémocultures au LRM, avait la fréquence de résistance à la Céfotaxime la moins élevée. Elle était suivie de près par l'espèce *Escherichia coli* (50%).

Ahoyo AT et alliés au Benin avaient obtenu 67,6% de résistance à *Escherichia coli*, 100% pour *Acinetobacter baumannii complex* et 68,2% pour *Pseudomonas aeruginosa* (25).

6.4.3. Fréquence de la résistance à la Ceftazidime

Pseudomonas aeruginosa, *Citrobacter*, et *Enterobacter cloacae complex* présentaient une résistance totale (100%) à la Ceftazidime. Tandis que, les espèces telles que *Acinetobacter baumannii complex* (83,3%), *Klebsiella pneumoniae* (83,3%), *Staphylococcus aureus* (75%) avaient une résistance modérément faible à la Ceftazidime.

Saib KB et alliés en Arabie Saudi avaient trouvé 89% de résistance à l'espèce bactérienne *Acinetobacter baumannii complex* (26).

6.5. Conservation des souches

Les souches étaient constituées par l'ensemble des bactéries multi résistantes, qui avaient un intérêt sur le plan de la surveillance des infections bactériennes.

En effet, dans le cadre de la mise en place de la surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques, un protocole avait été mis en place au sein du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako . Les espèces bactériennes le plus recherchées étaient :

- *Salmonelles spp*
- *Staphylococcus aureus* (Methicyline, Vancomycine Résistantes)
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa...*

Les souches bactériennes étaient préparées et conservées dans un congélateur à - 80°C. Ces souches pourraient servir de références pour des éventuelles études beaucoup plus approfondies.

7. Conclusion

La maîtrise des BMR constitue un problème en santé publique. Ce travail a permis de mettre en place un système de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques dans les hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako. Il a permis d'isoler des souches de bactéries multi résistantes aux antibiotiques dans les hémocultures reçues aux Laboratoire Mérieux.

8. Recommandations

- Aux autorités sanitaires :
 - Mettre en place en collaboration avec le Ministère de la Santé publique, un programme de lutte contre les infections nosocomiales et des bactéries multi résistantes afin de maîtriser la diffusion des souches de phénotype BLSE et d'éviter l'évolution vers l'impasse thérapeutique.
- Au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux :
 - Instituer avec l'appui de Gouvernement de la république, une structure qui serait un pôle de référence dans le diagnostic des bactériémies/septicémies responsables d'infections dues aux micro-organismes.
 - Etendre l'étude sur plusieurs années pour avoir un échantillonnage plus représentatif.
 - Développer un outil moléculaire de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques
- Aux praticiens médicaux :
 - Appliquer les bonnes pratiques de prescription et de dispensation des antibiotiques à la population.

9. Références bibliographiques

1. Anagonou Sy, Akpona S., Josse R., Massougbojji A., et coll., Les isolements de bactéries dans les hémocultures au laboratoire bactériologie du C.N.H.U Cotonou (1987-1990). *Med Afr Noire* 1993 ; 40 : 614-9.
2. Sora N, Zougaghi L, Zahlane K, Admou B. Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémocultures dans un centre hospitalo universitaire marocain. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. Avril 2011; Vol.5, N°2 : 78 - 81.
3. Gazagne L, Hernandez B, Nougaret A, Vergely S. Guide pratique de la maîtrise des bactéries multi résistantes aux antibiotiques. *Inter Clin des Hauts Cantons de l'Hérault* 2009; France.
4. Fauchère J. *Technique de bactériologie clinique* Edition marketing S.A, 1997 : 77-79.
5. Le Moing V, Psomas C. Septicémies - Faculté de Médecine de Montpellier-Nîmes. Année universitaire 2010-2011. *Maladies Infectieuses et Tropicales CHRU de Montpellier* Février 2011. Disponible sur: www.med.univ-montp1.fr/.../Medecine.../ECN_104_Septicemie_bis (consulté le 20 Mai 2014 à 16h07mn)
6. Fauchère JL, Avril JL. *Bactériologie générale et médicale*. Ellipses Edition Marketing S.A, 2002; Paris.
7. APPIT Bactériémie, Sepsis et Choc septique, 15ème édition. E. PILLY, Montmorency: 2M2, 1996: 19-25.
8. Vandepitte J et coll. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. Genève 2003; Page 120.
9. Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H. *Bactériologie clinique*. 3ème Edition pages: 6-60. 3ème éd. Paris.
10. Singleton P, Sainsbury D. *Bactériologie*. Masson, 1984; Page 158. Paris.
11. Gastinel P. *Précis de bactériologie médicale*. Masson, 1954; Pages: 12-44. Paris.
12. Flandrois JP. *Bactériologie médicale*. Presses universitaires de Lyon, 1997; Pages: 107-99.

13. Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie. Bactériologie. Chapitre 6: Les bactéries à Gram positif non sporulés. Disponible sur:
www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.6.2.html (consulté le 22 Mai à 15h54mn)
14. Leminor L, Veron M. Bactériologie médicale. Flammarion, 1989; pages:773-94. Paris.
15. Berche P, Gaillard JL. Bactériologie: les bactéries des infections humaines. Flammarion, 1989; Pages 230-39. Paris.
16. E. pilly-Préparation ECN: Prescription et surveillance des antibiotiques. Disponible sur:
http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/ECN/38-ECN-item_173.pdf
17. Koné MS. Bilan de sept (7) ans d'hémoculture en milieu hospitalier pédiatrique de Bamako. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N° 13; 2010.
18. BECTON, DICKINSON and Company, 2004. BACTEC 9050 Manuel d'utilisation. MA-0103. Révision : E Réf 445845.
19. Leclercq. Microbiologie générale. 2ème édition, 1983; Pages: 199-202. Paris.
20. Ousmane M. Etude des contaminants des hémocultures au laboratoire de bactériologie du cvd du chu gabriel toure de 2002 à 2006. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N° 09P07; 2008.
21. Samaké M. Pratique de l'hémoculture au laboratoire d'analyses médicales de l'Hôpital Gabriel Touré. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N°04P06; 2004.
22. Soude Séna Gbénou Adébola A. Bactéries isolées des hémocultures au laboratoire du centre national hospitalier et universitaire hubert koutoukou maga de cotonou. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N° 84; 2005.
23. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé: Course contre la montre pour mettre au point de nouveaux antibiotiques. Disponible sur:
<http://www.who.int/bulletin/volumes/89/2/11-030211/fr/> (Consulté le 16/06/2014 à 14h18mn)
24. Niandou Tahirou Moustapha. Sensibilité et évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques. Université de Bamako, Thèse de Pharmacie N° 05P79; 2005

25. Ahoyo TA, Bankolé HS, Adéoti FM, Gbohoun AA, and al. Prevalence of nosocomial infections and anti-infective therapy in Benin: results of the first nationwide survey in 2012. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2014; 3:17.

26. Said KB, Al-Jarbou AN, Alrouji M, Al-Harbi HO. Surveillance of antimicrobial resistance among clinical isolates recovered from a tertiary care hospital in Al Qassim, Saudi Arabia. *Int J Health Sci*. janv 2014; 8 (1) : 3-12.

Fiche signalétique

Nom(s) : MOUDJONGUE OMOCK

Prénom : Sandrine

Titre de la thèse : Mise en place d'un système de surveillance des résistances bactériennes : cas des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako.

Année universitaire : 2013-2014

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Cameroun

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Médecine, Pharmacie et d'Odontostomatologie

Secteur d'intérêt : Bactériologie

Résumé

La multi résistance bactérienne est un problème majeur en santé publique. Le but de notre travail était de mettre en place un système de surveillance des résistances aux antibiotiques des bactéries associées aux septicémies dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) de Bamako.

Nous avons réalisé une étude transversale de janvier 2013 à décembre 2013, chez des patients adressés pour hémoculture au LRM. Nous avons utilisés la méthode automatisée de VITEK 2 compact et la méthode manuelle pour l'identification et la réalisation des antibiogrammes. Les recommandations de la Communauté Académique de la Société Française de Microbiologie (CA- SFM) de 2013 ont été utilisées pour l'interprétation des résultats.

Les entérobactéries viennent en première position des isollements avec 30,8% d'*Escherichia coli* ; 15,4% de *Klebsiella pneumoniae*, c'est également le groupe de bactéries qui présente la proportion la plus élevée de multi résistance. Cependant, le pourcentage de contamination est de 18,9.

Notre étude nous a permis d'écrire et de valider les MON essentiels à la réalisation des hémocultures au LRM. Nous avons constaté, que la prévalence des BMR aux antibiotiques est élevée (24/238).

Mots clés : Bactérie – Multi résistance – Hémoculture – LRM – Bamako.

Abstract

The multi bacterial resistance is a major problem in public health. The goal of our work was to put a system of surveillance of the resistances in place to the antibiotics of the bacteria associated to the septicemia in the Laboratory Rodolphe Mérieux (LRM) of Bamako.

We achieved a transverse survey from January 2013 to December 2013, among patients addressed for hémoculture in the LRM. We used the method automated of compact VITEK 2 and the manual method for identification and the realization of the antibiogrammes. The recommendations of the Academic Community of the Microbiology Society French (AC - MSF) of 2013 have been used for the interpretation of the results.

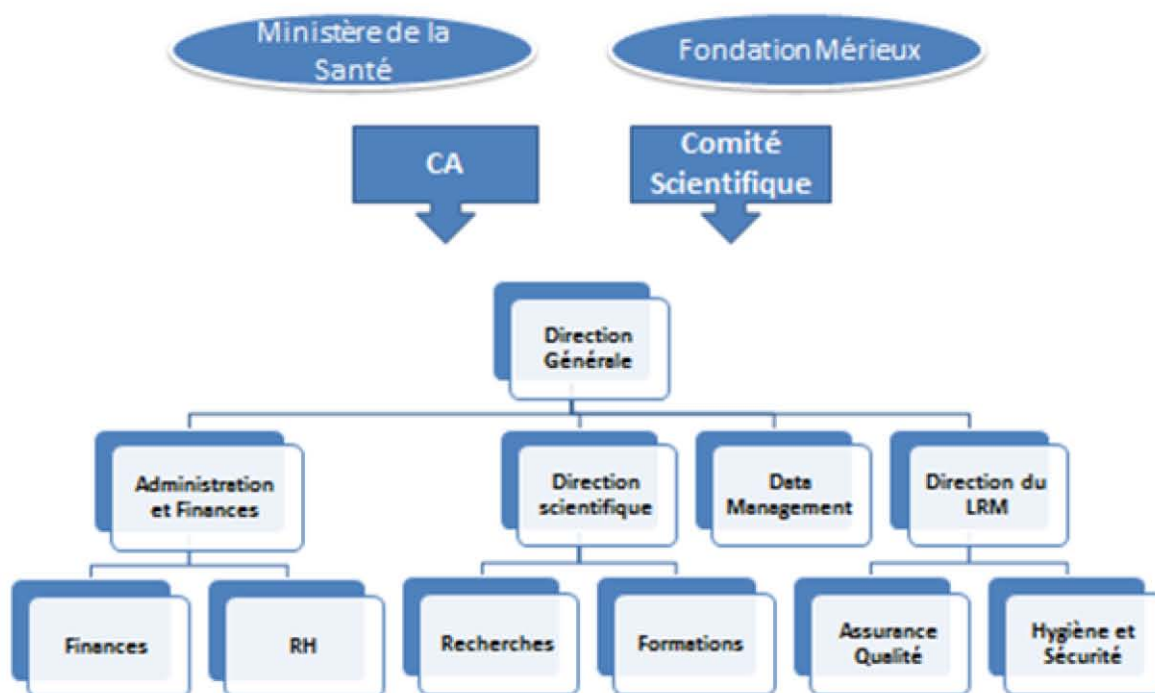
The enterobacteria comes in first position of the isolations with 30, 8% of *Escherichia coli*; 15, 4% of *Klebsiella pneumoniae*, it is also the group of bacteria that presents the most elevated proportion of multi resistance. However, the percentage of contamination is of 18, 9.

Our survey we permitted to write and to validate the SOPs essential to the realization of the hemocultures in the LRM. We noted, the prevalence of the BMR to the antibiotics is raised (24/238).

Key words: Bacteria – Multi resistance – Blood culture – LRM – Bamako.

Annexes

Annexe 1 : Organigramme du Centre Charles Mérieux(CICM)



ORGANIGRAMME DU C.I.CM



Annexe 2 : MODE OPERATOIRE D'UTILISATION BacT/ALERT 3D –

Rédigé le:	10 mars 2010	Par : Abdoulaye TOURE	AT	
Modifié le:	20 mars 2013	Par : Lassina DOUMBIA	LD	
Vérifié le:	04 juin 2013	Par : Abdoulaye TOURE, Judicaël OUEDRAOGO, Boula KANOUTE, Nana KEITA	AT, JO, BK, NK	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:	Mise à jour des documents assurances qualités.			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

Directeur Général	Biologistes	Responsable Assurance Qualité	Responsable technique	Stagiaires
-------------------	-------------	-------------------------------	-----------------------	------------

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
-Classeur bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité LRM

P:

MO:

D:

E:

I – But

Décrire le mode opératoire d'utilisation du BacT/ALERT 3D

II - Domaines et personnels concernés

Tout le secteur de bactériologie du centre d'Infectiologie Charles Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser le BacT/ALERT 3D

III - Abréviations/Définitions

IV – Référence

MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU BacT/ALERT 3D

1. PRINCIPE.....

2. REACTIFS.....

3. UTILISATION EN ROUTINE.....

3.1. MISEEN ROUTE.....

3.1.1. MISE EN ROUTE DE L'APPAREIL.....

3.1.2. ACCES Au CLAVIER DU MODULE DE CONTROLE.....

3.1.3. CHARGEMENT DES FLACONS.....

3.1.4. VISUALISATION DE LA COURBE D'EVOLUTION

BACTERIENNE.....

3.1.5. DECHARGEMENT DES FLACONS.....

1. Principe

C'est une étuve incubant des flacons d'hémoculture et des flacons de mycobactéries, à 37° C, avec un mouvement d'agitation régulier, munie d'un système de lecture optique lisant toutes les 10 minutes.

Le principe de détection des micro-organismes est basé sur la modification de couleur d'un indicateur colorimétrique. Cet indicateur est situé à la base des flacons, séparé du liquide par une membrane perméable au dioxyde de carbone (CO₂). Le CO₂ est produit par le métabolisme des micro-organismes et passe à travers la membrane de manière passive, ce qui produit une réaction chimique acidifiant l'indicateur colorimétrique. Ceci a pour effet de le faire changer de couleur.

A intervalles réguliers, toutes les 10 minutes, un faisceau lumineux est émis en direction de l'indicateur colorimétrique. La lumière réfractée par l'indicateur colorimétrique est captée par un capteur. Celui-ci reçoit le faisceau puis cette information est ensuite envoyée dans le logiciel de traitement. Le signal recueilli est ensuite analysé selon trois algorithmes

(Seuil, delta et pente).

2. Réactifs

Le BacT/ALERT 3D utilise les flacons de culture à usage unique, auxquels sont ajoutés les échantillons à tester.

Chaque flacon contient un détecteur de CO₂ qui sert d'indicateur de la croissance microbienne.

Le flacon de culture BacT/ALERT 3D est prêt à l'emploi. Une date de péremption figure sur l'étiquette de chaque flacon, ne pas utiliser les milieux après le dernier jour du mois indiqué.

Si les flacons sont conservés réfrigérés, il peut se former un précipité qui disparaît

lorsque les flacons sont portés à la température ambiante (15-30°C).

Conserver les flacons à l'abri de la lumière et à la température ambiante.

- **Les différents types de flacons :**

- Les flacons d'hémoculture (BC)
 - ✓ Le flacon aérobique (FA) Réf : 259791
 - ✓ Le flacon anaérobique (FN) Réf : 259793
 - ✓ Le flacon pédiatrique (FP) Réf : 259794

NB : Utiliser uniquement les flacons aérobiques chez les nourrissons (0-6mois) ou flacon pédiatrique (FP)

- Les flacons de culture des mycobactéries (MB)
 - ✓ Les flacons (MB/BacT) MP Réf : 259797 sont utilisés pour la culture des mycobactéries.

3. Utilisation en routine

3.1. Mise en route

3.1.1. Allumer l'appareil

L'appareil BacT/ALERT 3D est une étuve qui doit rester en permanence en marche.

- Allumer d'abord le module combo droit (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT/ALERT 3D) ;
- Allumer ensuite le module combo gauche (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT/ALERT 3D) ;
- Allumer en fin le module de contrôle (Appuyer sur l'interrupteur placé en haut dans l'arrière droit du BacT/ALERT 3D).

3.1.2. Accès au clavier du module de contrôle

Il existe deux types de tiroirs à clavier, le modèle A et le modèle B

Pour accéder au clavier du tiroir du modèle B

- Tirer complètement le tiroir à clavier au bas du module de contrôle. Le tiroir révèle un couvercle comprenant une glissière pour la carte aide-mémoire.

- Soulever le couvercle à partir de l'avant pour accéder au clavier.

3.1.3. Chargement des flacons




1. Appuyer sur l'**image flacon** de l'écran principal. L'écran mode de chargement apparaît ;
2. S'assurer que le champ ID de flacon apparaît blanc, puis scanner ou entrer manuellement l'ID du flacon ;
3. S'assurer que le type de flacon approprié est affiché sur le bouton de défilement de type de flacon ;
4. S'assurer que le champ numéro d'examen est blanc, puis scanner ou entrer manuellement le numéro d'examen ;
5. Si les champs sont affichés et activés, saisir manuellement les informations suivantes dans l'ordre indiquant :
 - Identité échantillon.
 - Heure d'incubation.
 - Nom du patient.
 - Prénom du patient.
6. La durée maximale du test par défaut s'affiche au dessus du bouton modification de la durée maximale de test ;
7. Si tous les tiroirs sont fermés, ouvrir lentement un tiroir comportant un voyant allumé. Les voyants des cellules disponibles sont allumés ;
8. Introduire le flacon (le détecteur colorimétrique en avant) dans une cellule avec un voyant allumé ;
9. Le voyant de la cellule clignote lentement pour indiquer que le flacon est chargé ;
10. Vérifier que tout le texte des champs s'efface avant de poursuivre ;
11. Répéter les étapes 2 à 10 pour chaque flacon restant. Les flacons peuvent être chargés dans le même tiroir jusqu'à ce que toutes les cellules disponibles soient remplies. A ce stade refermer délicatement le tiroir et ouvrir un autre tiroir comportant un voyant allumé.

12. Lorsque tous les flacons sont chargés, vérifier que tous les tiroirs sont bien fermés, appuyer sur le bouton valide ;

13. Lorsque la saisie manuelle est terminée, le clavier peut être replacé sous le couvercle ; fermer le tiroir en appuyant sur les deux languettes latérales tout en repoussant le tiroir.

3.1.4. Visualisation de la courbe d'évolution bactérienne

A partir de l'écran principal :

1. Appuyer sur l'icône 
2. Appuyer sur **1 234**  Cardenas s'ouvre : la page est active.
3. Appuyer sur la 3^{ème} icône dans la 2^{ème} colonne de l'écran affiché.
4. Scanner le code barre de l'échantillon.
5. Appuyer sur  l'icône en bas et à droite : la courbe d'évolution s'affiche.

3.1.5. Déchargement des flacons

L'automate BacT/ALERT 3D indique les types de flacons prêts à être déchargés en appuyant sur **l'image flacon** soit : **positif ; négatif ; plus ou moins ; point d'interrogation**.

NB : Pour préserver l'intégrité des données de test, manipuler un seul flacon à la fois. Il est important de terminer la procédure pour chaque flacon avant de poursuivre avec le flacon suivant.

1. Vérifier que les flacons à décharger sont répertoriés dans le rapport de déchargement.
2. Appuyer sur **l'image flacon** approprié de l'écran principal. Cette action a pour but :
 - de faire apparaître l'écran mode de déchargement.
 - d'allumer les voyants verts des tiroirs contenant des flacons du type de flacon à décharger sélectionné.
3. Ouvrir le tiroir indiqué. Lorsque le tiroir indiqué est ouvert, les voyants des cellules s'allument à côté de tous les flacons de la catégorie sélectionnée.
4. Sortir un des flacons indiqués. Le voyant de la cellule clignote lentement pour indiquer le déchargement du flacon.
5. Si le flacon était identifié au chargement :

- L'ID du flacon, son type, l'ID laboratoire ainsi que le nom et prénom du patient s'affichent dans les champs des tests désactivés, de l'écran mode de déchargement, le cas échéant,
 - Il n'est pas nécessaire de scanner de nouveau l'ID du flacon, cependant, cela permet d'en vérifier l'identité.
6. Si le flacon a été chargé anonymement (le champ **ID du flacon** est vierge), scanner ou saisir manuellement l'**ID du flacon**.
 - Identifier le flacon en entrant l'ID du flacon, le type de flacon, l'ID laboratoire ainsi que le nom et prénom du patient.
 - Si le flacon doit être rechargé, le remettre immédiatement dans la cellule dont le voyant clignote lentement, avant de décharger un autre flacon.
 7. Répéter les étapes 3 à 5 pour les flacons restant à décharger.
 8. Après avoir effectué le déchargement des flacons, vérifier que tous les tiroirs sont bien fermés.
 9. Appuyer sur le bouton **valider** de l'écran mode de déchargement.

Procédure de maintenance. Cf. manuel d'utilisation BacT/ALERT 3D.

Procédure de gestion des pannes. Cf. manuel d'utilisation BacT/ALERT 3D.



Annexe 3 : MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM – Version N° 2

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	02/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	TZ	
Vérifié le :	25/03/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:	Mise à jour des documents assurance qualité			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des analyses en bactériologie

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de coloration de Gram.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM
--

Principe

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'un des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique des bactéries ;
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool-acétone.

Matériel

- Microscope ;

- Blouse ;
- Bac de coloration ;
- Plaque chauffante ;
- Bec bunsen ;
- Centrifugeuse.

Consommable

- Gants ;
- Lames porte objet ;
- Tube conique ;
- Pipette pasteur.

Réactif

- Colorants : violet de gentiane, le lugol, l'alcool-acétone, la fuchsine.
- L'huile d'immersion.

Nature du prélèvement

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

Contrôle de qualité

Les lames positives (frottis préparés avec une souche de bactérie connue) sont conservées et utilisées comme lames de référence.

Technique

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;
- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30secondes ;

- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ;
- Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

Résultats

Après coloration de Gram, les bactéries apparaissent sous différentes morphologies et teintes :

- Bactéries Gram négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet



Annexe 4 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE
- Version N° 2

Rédigé le:	24/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	
Vérifié le:	036/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	
Vérifié le :	22/02/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	27/08/2013	Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Diffusé le :	30/08/2013	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	
Objet de la modification:	Mise à jour des documents assurance qualité			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUYE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J. OUEDRAOGO	B. KANOUE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des examens Bactériologique

MO:

D:

E:

I – But

Décrire la technique du test de la catalase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

1. But :

La recherche de la catalase est réalisée pour différencier le genre :

- Streptococcus (catalase négative) du genre Staphylococcus (catalase positive)
- Bacillus (catalase positive) du genre Clostridium (catalase négative)
- Listeria (catalase positive) et/ou Corynebacterium (catalase positive) du genre Erysipelothrix (catalase négative)

2. Principe

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. La présence de catalase est détectée chez les micro-organismes par une libération d'oxygène à partir d'eau oxygénée.

La présence d'un agent épaississant et d'un colorant facilitent l'observation du dégagement gazeux.

3. Matériel

- Le réactif de catalase
- La lame porte-objet ;
- Le bâtonnet ;
- La souche pure.

4. Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée vis à vis des souches suivantes :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la catalase est **positive**
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la catalase est **négative**

5. Réalisation du test

Laisser les flacons revenir à température ambiante

- **Test sur lame**
 - Déposer sur la lame une goutte du réactif de la catalase ;
 - A l'aide d'un bâtonnet, bien triturer 1 à 2 colonies dans la goutte.
- **Test direct sur le milieu de culture**
 - Déposer une goutte d'ID color catalase directement sur la colonie.

6. Résultat

Le test doit être réalisé sur des colonies de 18 à 24 heures après incubation. Les colonies plus âgées pourraient perdre leur catalase et donner des faux négatifs. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles ;

Les entérobactéries sont toutes des bactéries catalase positive, à l'exception de *Shigella dysenteriae* ;

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont en général, catalase positive telles que *Pseudomonas, Acinetobacter*... ;

Quelques cocci à Gram positif son catalase positive comme les Staphylocoques.

7. Gestion des déchets

Les objets tranchants sont jetés dans une boite de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune.



Annexe 5 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE -
Version N° 2

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	28/02/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Fatoumata MAIGA	FM	
Vérifié le :	25/03/2013	Par : Boula KANOUE	BK	Visa :
Approuvé le:	28/08/2013	Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Diffusé le :	30/08/2013	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	
Objet de la modification:	Mise à jour des documents assurance qualité			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUYE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des examens Bactériologique

MO:

D:

E:

I – But

Décrire la technique du test de l'oxydase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

But du test :

La recherche de l'oxydase permet :

- D'identifier le genre *Neisseria spp* (positif)
- De séparer les Entérobactéries (négatif) des espèces du genre *Pseudomonas* (positifs pour la plupart)
- De différencier *Moraxella* (positif) et *Neisseira* (positif) d'*Acinetobacter* (négatif)
- De différencier *Pseudomonas maltophilia* (négatif) des autres *Pseudomonas sp* (positif)
- D'aider à l'identification d'*Aeromonas* (positif), *Alcaligenes* (positif), *Branhamella*

(positif) et *Yersinia* (négatif).

Principe

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire.

En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif phénylènediamine, pour former un composé coloré en violet, l'indophénol.

L'acide ascorbique, incorporé dans le réactif, agit en tant qu'agent réducteur pour limiter l'auto-oxydation et améliorer la stabilité du réactif. Cette formulation est basée sur la formule de la réactive oxydase de Kovac.

Matériel

- Anse (en platine, plastique).
- Disques non imprégnés de diamètre 6 mm.

Condition de stockage

- Les réactifs se conservent entre 18°C et 25°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- Ne pas congeler.
- Conserver à l'abri de la lumière.
- Le réactif oxydase s'auto-oxyde rapidement et perd sa sensibilité. Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 24 heures.

Nature de l'échantillon

L'échantillon est constitué d'une colonie isolée pour laquelle on veut détecter l'enzyme cytochrome oxydase. Cette colonie doit être issue d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux de culture gélosés solides.

Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée à l'aide des souches suivantes cultivées sur géloses Trypcase-Soja(ou Drygalski) :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Escherichia coli* ATCC 25922

Souche	Résultats
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Positif : coloration violette
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif : pas de coloration

Réalisation du test

- Placer le flacon compte-gouttes dans le briseur d'ampoule.
- Tapoter le fond du flacon pour éliminer les bulles qui auraient pu s'y former.
- Saisir le milieu de l'ensemble flacon/briseur et appuyer doucement pour briser l'ampoule.
- Distribuer précisément une goutte de réactif sur un disque non imprégné de diamètre 6 mm.
- Etaler la colonie sur le disque.

Résultat

- **Lecture et interprétation**
 - L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.
 - Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif.

NB :

- La réaction d'oxydase ne doit pas être réalisée sur des colonies obtenues sur gélose EMB ou CHAPMAN 2, ni sur des colonies issues d'une culture de 48 heures sur des milieux gélosés solides.

- La recherche de l'oxydase ne doit pas être effectuée sur des colonies isolées présentant une coloration spontanée (couleur violette, rose, noire...). Dans ce cas, la lecture du test est impossible.
- L'utilisation d'un volume de réactif trop important peut entraîner des résultats faussement négatifs. N'utiliser qu'une seule goutte de réactif comme indiqué dans le mode opératoire.
- Il est conseillé d'utiliser une anse ou une aiguille en platine ou en plastique pour le test de l'oxydase. Toute trace de fer (nichrome) peut catalyser la réaction de l'oxydase et conduire à une réaction faussement positive.
- Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 12 heures.
- Les germes faiblement producteurs d'oxydase comme les *Pasteurella*, peuvent donner des résultats négatifs.
- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir en cas de cultures mixtes de *Pseudomonas* et *Neisseria*. Une substance inhibitrice est produite par *Pseudomonas spp.* interférant avec la production d'oxydase de *Neisseria spp.*

Gestion des déchets

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.



Annexe 6 : MODE OPERATOIRE DU TEST DE LA COAGULASE
Version N° 1

Rédigé le:	23/02/2013	Par : Doussou COULIBALY	DC	
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O.HAIDARA	L.SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des examens Bactériologique

MO:

D:

E:

I – But

Décrire la technique du test de la coagulase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DU TEST DE LA COAGULASE

Principe

Le BBL Coagulase Plasma, Rabbit (Plasma de lapin pour test de la coagulase BBL) servent à déterminer qualitativement la pathogénicité des Staphylocoques par la méthode directe en tube.

Cette méthode consiste à mélanger une culture en bouillon de la veille ou des colonies prélevées sur une boîte de gélose non inhibitrice dans un tube de coagulase plasma réhydraté. Le tube est incubé à 37°C pendant une durée de 4H, la formation d'un caillot dans le plasma indique une production de coagulase.

Matériel

- Tube sec ;

- Anse ;
- Souche pure ;
- Bec bunsen ;
- Portoir tube ;
- Etuve ;
- Chronomètre.

Réactif

Le coagulase Rabbit est un plasma de lapin lyophilisé contenant environ 0,85% de citrate de sodium et 0,85% de chlorure de sodium.

Conservation du réactif

Le BBL coagulase plasma, Rabbit non ouvert se conserve entre 2 – 8°C

Le Plasma reconstitué se conserve à 2 – 8°C jusqu'à 14jours, ou aliquoter et congeler immédiatement à – 20°C jusqu'à 30jours, ne pas recongeler une fois décongeler.

Nature du prélèvement

Les colonies pures sur une souche gélosée ou en bouillon

Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs sont testés aux souches de références pour vérifier la conformité des performances du coagulase Plasma avec les spécifications.

Microorganisme	ATCC	Réaction
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Caillot dans le tube
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	Absence de caillot dans le tube

Réalisation du test

- Préparation des réactifs
 - Réhydrater le BBL Coagulase Plasma en ajoutant de l'eau purifiée dans le flacon comme indiqué ci-dessous puis mélanger en retournant alternativement le flacon.

Volume de produit	Eau purifiée stérile	Nombre approximatif de test
3 ml	3 ml	6
15 ml	15 ml	30
25 ml	25 ml	50

- Réalisation du test de BBL Coagulase
 - A l'aide d'une micropipette de 1 ml, ajouter 0,5 ml de BBL Coagulase Plasma, Rabbit réhydraté à un tube à culture sur un portoir ;
 - Ajouter environ 0,05 ml de culture en bouillon de la veille du microorganisme à tester dans le tube de plasma. Il est également possible, à l'aide d'une anse en plastique stérile, d'émulsifier complètement dans le tube de plasma 2 – 4 colonies prélevées sur une boîte de gélose ;
 - Mélanger doucement ;
 - Incuber au bain-marie ou à l'étuve à 37°C pendant 4heures ;
 - Examiner périodiquement les tubes en les inclinant doucement. Ne pas agiter le tube pour ne pas risquer de désagréger le caillot et par conséquent d'entraîner des résultats de test douteux ou faussement négatifs. **Tout degré de coagulation dans un délai de 3 – 4 heures doit être interprété comme un résultat positif.** De nombreuses souches productrices d'enzymes ne coaguleront le plasma qu'au bout de 24heures d'incubation.

Résultat

- **Si la coagulase est négative :** absence de formation de caillot, laisser jusqu'à 24heures sur la paillasse ;
- **Si la coagulase est positive :** le caillot ne se détache pas lorsque le tube est retourné. Suspicion de *Staphylococcus aureus*.

Aspect avant

Aspect du test positif

Aspect du test négatif

Ensemencement



Gestion des déchets

Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (contaminant).



Annexe 7: MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE -Version N° 2

Rédigé le:	20/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AL	
Vérifié le:	07/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	11/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	23/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	
Vérifié le :	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YACOUYE	DY	Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:	Mise à jour des documents assurance qualité			
Archivé le :				

Document provisoire **Document opérationnel****Destinataires**

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des examens Bactériologique

MO:

D:

E:

I – But

Décrire la technique du test à l’Optochine en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d’utilisé cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DU TEST A L’OPTOCHINE

Prince

Ce réactif permet de tester la sensibilité des streptocoques vis-vis de l’optochine.

L’espèce *Streptococcus pneumoniae* est généralement sensible à l’optochine contrairement aux autres streptocoques, en particulier les streptocoques alpha hémolytique.

Matériel

- Jarre ;
- Etuve bactériologique ;
- Disque d’optochine.

Conservation des disques

- Les disques se conservent entre 2 – 8°C dans leur flacon jusqu'à la date de péremption ;
- Conserver à l'abri de la lumière ;
- Après ouverture, les disques se conservent 3 mois à 2 – 8°C dans leur flacon.

Nature du prélèvement

Le test est réalisé à partir d'un ensemencement en culture pure d'une souche isolée de Streptocoques.

Contrôle de qualité

L'activité des disques peut être vérifiée sur gélose au sang frais avec la souche suivante : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Avec la zone d'inhibition après 24heures à 37°C : 15 à 35mm.

Réalisation du test

- Laisser le flacon de disques revenir à température ambiante ;
- A partir d'une ou plusieurs colonies de la souche à tester, ensemercer en tries serrées une boîte de gélose au sang afin d'obtenir des colonies confluentes ;
- Déposer un disque d'optochine à la surface de la boîte ensemencée ;
- Placer la boîte en atmosphère appropriée (enrichie en CO₂) ;
- Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C pendant 24heures.

Résultat

- Lecture et interprétation
 - Après incubation, observer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'optochine : Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 15mm est une présomption de *Streptococcus pneumoniae* ;
 - L'identification du micro-organisme peut être poursuivie par des tests biochimiques et immunologiques, le VITEK 2 compact, le Mini Api.



**Annexe 8: MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DU VITEK 2
COMPACT -Version N° 1**

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Sandrine S MOUDJONGUE OMOCK		
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

 Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des analyses en bactériologie Procédure de gestion des déchets

MO:

D:

E:

I – But

Décrire le mode d'utilisation du VITEK 2 compact.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cet appareil.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

Manuel d'utilisation du VITEK 2 compact.

V – Contenu

MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT

Principe

Le système VITEK 2 compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique.

Le système comprend l'instrument VITEK 2 compact, un ordinateur et une imprimante.

Le logiciel fourni par le système VITEK 2 compact inclut des programmes d'analyses, de gestion de données et un système de contrôle de qualité afin de valider le kit test du VITEK 2 compact.

Mode opératoire

- Prendre le flacon eau saline VITEK 2, introduire la dispensette ;
- Prendre des tubes secs pour VITEK 2, y introduire dans les puits de la cassette ;
- La cassette peut prendre jusqu'à 10 tubes soit 2x5 (identification+ antibiogramme) ;
- Mettre dans chaque tube, 3ml de la solution saline du VITEK 2 à l'aide de la dispensette préalablement réglée à 3 ml.

N.B : Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés : l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;
- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une anse, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien vortexer ;
- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à **0,5 Mc Ferland** ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;
- Préparer la solution pour antibiogramme :
 - Si la bactérie à identifier est à :
 - Gram positif, utiliser la micropipette calibrée à 280µl (bleue), Gram négatif, utiliser la micropipette calibrée à 145µl (rouge) ;
 - A partir de la suspension bactérienne, pipeter en fonction de la nature du germe suspecté (Bactéries à Gram négatif ou Bactéries à Gram positif) et diluer dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.
- Placer la carte d'identification (soit GN, soit GP ou YST) et la carte pour l'antibiogramme (soit AST- N, soit YST- P ou AST- P) en fonction de la nature du germe sur la cassette.

NB : différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
- Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233
- ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117
- Levures : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-YS01, réf 22108
- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;
 - Cliquer sur VITEK 2
 - Mettre Identifiant : **labsuper**, le mot de passe : **labsuper**
 - Cliquer sur gérer la cassette virtuelle
 - Créer une cassette virtuelle
 - Identification de la cassette 1,2,...
 - Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette
 - Saisir les données de l'isolat ;
 - Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)
- Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle
- Au niveau de l'automate VITEK 2 Compact,
- Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre ;
- Fermer le capot de remplissage ;
- Appuyer sur la touche **Lancer remplissage**, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;
- Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;
- Lorsque le message **retiré** s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le VITEK 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant **le capot chargement** puis le refermer ;
- On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

Résultats

Le VITEK 2 Compact est un appareil qui permet d'identifier les germes et de réaliser l'antibiogramme puis d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle

puis la sensibilité naturelle du germe.

Exemple : les bêta-lactamases des entérobactéries (*Klebsiella*, *E. coli*), *S.aureus* résistant à méthicyline et vancomycine, *Pseudomonas* résistant à l'imipénème...et les phénotypes des souches sauvages (le germe sensible à tous les antibiotiques testés excepté les sensibilités naturelles).

Gestion des déchets

▪ **Retrait des cartes éjectées :**

Pour éjecter une carte, le VITEK 2 Compact la retire du carrousel/incubateur, la présente au lecteur de cartes et la dépose dans le récipient collecteur de déchets. Le réceptacle collecteur de déchet peut contenir jusqu'à 60 cartes, il est recommandé de contrôler régulièrement le niveau du réceptacle collecteur de déchet et le vider.

▪ **Retrait du réceptacle collecteur de déchet :**

- Ouvrir le capot du récipient collecteur de déchets. Noter que les cartes usagées sont stockées à l'intérieur du réceptacle ;
- Retirer le réceptacle collecteur de déchet de la station de travail en tirant sur le bord avant, vers soi ;
- Jeter les cartes usagées dans la poubelle de déchets contaminés ;
- Remettre en place le réceptacle collecteur de déchets en le faisant glisser vers l'intérieur ;
- Fermer le capot du récipient collecteur de déchets.

Le VITEK 2 compact réinitialise le compteur de déchets si le réceptacle est entièrement vidé.



Annexe 9 : MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API –

Version N° 1

Rédigé le:	24/05/2005	Par :	Lala SIDIBE	
Vérifié le:	14/09/2005	Par :	Louis DEWEERDT	Visa :
Approuvé le:	15/09/2005	Par :	Fatou .T. FAYE	Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

Y. Issabre	L. Deweerdt	J. P. Lombart	Al. Sidibé	Aïssata Sidibé
F.T. Faye	S. Traoré	M. Maïga	L. Sidibé	

Exemplaires :

- Classeur Mini Api
- Classeur de Diffusion des documents du Laboratoire

Documents Qualité liés:

MAQ:

P:

MO:

D:

E:

I – But

Décrire l'utilisation en routine du Mini **API**

II - Domaines et personnels concernés

Secteur bactériologie. Les responsables techniques et plus particulièrement, les responsables de l'automate.

III - Abréviations/Définitions

ID 32 GN

ID 32 C

ATB UR

IV - Références

V – Contenu

Principe de fonctionnement : Le Mini API permet deux types de lecture.

- La lecture turbinéphéléométrique

Elle est destinée aux galeries turbinéphéléométrique.

Exemple : ID 32 GN

ID 32 C

ATB UR

Turbidimétrie : mesure de l'intensité de la lumière transmise (T) inversement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Néphélométrie : mesure de l'intensité de la lumière diffusée (D) à 30°C directement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Ces deux mesures permettent d'évaluer la densité bactérienne dans chaque cupule.

Le cycle d'une lecture turbidimétrique se fait en deux étapes :

1ère étape :

Entrée du chariot porte galerie et détection du code de la galerie

2ème étape :

Mesure sous la position sans filtre puis sortie du chariot porte galerie

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

- La lecture colorimétrique

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

Exemple: ID 32 STAPH

ID 32 E

Rapid ID 32 A

Rapid ID 32 STREP

Le Mini API effectue pour chaque cupule une mesure de transmission de la lumière dans 4 régions du spectre visible.

Le cycle d'une lecture colorimétrique se fait en 4 étapes :

1ère étape :

- 1ère entrée du chariot porte galerie
- Détection du code de la galerie
- Mesure sous filtre K60

2ème étape :

- 1ère sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous filtre K40

3ème étape :

- 2ème entrée du chariot porte galerie

- Mesure sous le filtre DT bleu

4ème étape :

- 2ème sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT vert

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

Mise en route

Il faut :

- Mettre le Mini API sous tension, l'interrupteur d'alimentation (marche/arrêt) est à l'arrière de l'appareil.

A la mise sous tension, la configuration interne du système est testée (identification du microprocesseur, taille de la mémoire).

Deux signaux sonores retentissent. Le Mini API a effectué avec succès les tests internes.

L'écran affiche brièvement la page de présentation du logiciel Mini API puis le menu principal apparaît.

Procédure d'utilisation.

- Description du logiciel

Le logiciel Mini API est composé de 6 modules :

SAISIE.

Ce module permet à l'utilisateur de créer les dossiers patients gérés par le Mini API.

Un dossier patient est identifié par une référence unique.

L'examen d'un dossier patient contient les informations relatives à un prélèvement.

Les résultats d'identification et d'antibiogramme concernant un prélèvement sont affectés d'un numéro d'ordre géré automatiquement.

L'examen d'un dossier patient peut contenir jusqu'à 5 germes.

CONSULT.

Ce module permet de visualiser les données du patient et de vérifier l'examen et les résultats associés.

COMM.

Ce module permet l'échange d'information entre le Mini API et le système informatique du laboratoire.

EXPERT.

Ce module intègre la gestion d'un système EXPERT permettant l'interprétation des résultats bruts des antibiogrammes enregistrés.

OUTILS.

Ce module regroupe tous les utilitaires du logiciel : Création et Mise à jour des Thésaurus, Sauvegarde/ Restauration / Extraction, Destruction des données.

Api /ATB.

Ce module permet d'effectuer des lectures de galeries d'identification ou d'antibiogramme sans créer un dossier patient et d'examen associé. Les résultats pour l'identification et l'antibiogramme ne sont pas enregistrés. Les résultats de l'antibiogramme ne sont pas expertisés.

- Réalisation d'un test

Avant d'effectuer la lecture des galeries, il faut :

1ère étape :

- Mettre en marche Mini API
- Attendre au moins 15 minutes (préchauffage) avant de commencer la lecture des galeries
- Création d'un dossier patient

2ème étape :

- Préparation des galeries pour la lecture
- Enlever le couvercle des galeries
- Ajouter les réactifs nécessaires pour la révélation de certains tests (se reporter à la notice d'utilisation des galeries).

3ème étape :

- Tirer l'arceau de protection

Attention :

Il est impératif de tirer complètement l'arceau de protection pour procéder à la sortie du chariot porte galerie.

L'arceau de protection délimite la surface pour le libre déplacement du chariot porte galerie.

Il ne doit pas être utilisé comme poignet pour déplacer l'instrument.

Ne rien poser sur l'arceau de protection lorsque celui-ci est tiré.

La sortie du chariot porte galerie est effectuée automatiquement par le logiciel Mini API au moment de la lecture automatique des galeries.

Important :

Ne pas toucher le chariot porte galerie durant le mouvement de celui-ci.

4ème étape

- Positionner la galerie sur le chariot porte galerie

5ème étape : lecture des galeries

- La lecture des galeries est déclenchée par le logiciel Mini API
- La lecture des galeries est automatique
- Le code de la galerie est lu et les résultats interprétés générant ainsi le traitement de la galerie correspondante: lecture turbinéphéléométrique ou colorimétrique.

Arrêt Mini Api

Lorsque le menu principal de mini Api est affiché, sortir de l'application

- Appuyer sur <SUPPR>
- Eteindre l'appareil
- Rentrer l'arceau de protection

Gestion des documents

Type de document	Contenant	Lieu	Durée de conservation
Document qualité	Classeur Assurance qualité Mini Api	Laboratoire Bactériologie	3 ans après la fin de leur utilisation
Traçabilité AQ	Registre de maintenance	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après
Document fabricant	Manuel d'utilisation et Manuel Instrument Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après



Annexe 10: MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE -Version N° 1

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Fatoumata Maïga	FM	
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YACOUYE	DY	Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Destinataires

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

- Classeur de Bactériologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de la réalisation des examens Bactériologique

MO:

D:

E:

I – But

Décrire le mode opératoire de la technique de souchothèque.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE
--

Prince

Il permet de conserver les bactéries multi-résistantes à -80°C en présence de glycérol à savoir :

- *Staphylococcus aureus* (Met-R et Vanco-R) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ;
- *Salmonelles* ;
- *Escherichia coli* ;
- *Klebsiella pneumoniae* ;
- *Streptococcus pneumoniae*.

Matériel

- Tube à hémolyse ;

- Portoir tube ;
- Micropipettes ;
- Embouts ;
- Cryotubes ;
- Tubes à vis ;
- Marqueur ;
- Congélateur (-80°C).

Réactif

- Glycérol ;
- ATB Médium.

Nature du prélèvement

Souche pure des bactéries multi-résistantes.

Enregistrement

L'enregistrement est fait dans le registre réservé à la souchothèque, puis sur le support informatique.

Technique

A partir d'une souche pure de BMR :

- Prendre un tube à hémolyse sur lequel on portera le numéro d'identification du patient et le nom de la bactérie à soucher ;
- Prendre de l'ATB médium et remplir le tube à hémolyse jusqu'à moitié ;
- Prélever à l'aide d'une anse quelques colonies isolées à partir de la purification qu'on introduira dans l'ATB médium, bien mélanger
- Mettre cette suspension à 37° C pendant 24h à l'étuve ;
- Prendre deux tubes de souchage (cryotubes) ;
- Mettre une étiquette portant le numéro de la souche correspondant aux trois premières lettres et chiffres du CODAT plus deux lettres de la souche plus le numéro d'ordre ;
- Ex : W04ECO001 (premier *E. coli* souche en Avril 2012)

- Prendre soin de porter l'enregistrement dans un classeur prévu à cet effet ;
- Ensuite mesurer 800 µl de la suspension déjà préparée, mélanger avec 200 µl de glycérol puis vortexer et conserver le tout à -80° C ;
- Faire le même pour les deux cryotubes.

Conservation des échantillons

Les souchothèques sont conservées au congélateur à – 80°C.

Gestion des déchets

Les objets souillés sont éliminés dans la poubelle jaune (contaminant).

Annexe 11 : Exemples de fiches de rangement des bactéries multi résistantes

BOITE 3 / MICROORGANISME: E. coli

POSITION	N° SOUCHE	N° CODAT	AGE	SEXE	DATE RANGE	ORIGINE (HOSPI,COMMU)	PRELEVEMENT	Identification (espèce)	MECANISME (BLSE ...)
64	32	Y0221024	6MOIS	F	25/02/2014	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
65	33	Y0228045	25	M	04/03/2014	HGT	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
66	33	Y0228045	25	M	04/03/2014	HGT	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
67	34	Y0227061	32	M	05/03/2014	HGT	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
68	34	Y0227061	32	M	05/03/2014	HGT	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
69	35	Y0310027	29	M	14/03/2014	H DU PT G	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
70	35	Y0310027	29	M	14/03/2014	H DU PT G	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
71	36	Y0310077		F	13/03/2014	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
72	36	Y0310077		F	13/03/2014	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
73	37	Y0329011	47	F	03/04/2014	HGT	HEMOCULTURE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
74	37	Y0329011	47	F	03/04/2014	HGT	HEMOCULTURE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
75	38	Y0331030	44	F	03/04/2014	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
76	38	Y0331030	44	F	03/04/2014	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
77	39	Y0411303	60	M	15/04/2014	HPG	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
78	39	Y0411303	60	M	15/04/2014	HPG	URINE	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
79	40	Y0414044	75	F	18/04/2014	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
80	40	Y0414044	75	F	18/04/2014	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>E coli</i>	BLSE/Vitek
81									

Le n° de la souche correspond au 3 premiers lettres et chiffres de CODAT +2 lettres de la souche + le numero d'ordre. Ex: W12ECO20 (20ème E. coli isolé en Dec,2012)

BOITE 1 /MICROORGANISME: *Pseudomonas aeruginosa*

POSITION	N° SOUCHE	N° CODAT	AGE	SEXE	DATE RANGE	ORIGINE (HOSPI,COMMU)	RELEVEMEN	Identification (espèce)	MECANISME (BLSE ...)
1	1	W0507002	37	M	11/05/2012	H DU MALI	CRACHAT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
2	1	W0507002	37	M	11/05/2012	H DU MALI	CRACHAT	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
3	2	W1018312	38	M	24/10/2012	HGT	LIQ ARTICU	<i>Acinetobactere</i>	BLSE/VITEK
4	2	W1018312	38	M	24/10/2012	HGT	LIQ ARTICU	<i>Acinetobactere</i>	BLSE/VITEK
5	3	W1129037	76	F	05/12/2012	HGT	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
6	3	W1129037	76	F	05/12/2012	HGT	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
7	4	X0104051	7	M	09/01/2013	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
8	4	X0104051	7	M	09/01/2013	COMMUNAUTAIRE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
9	5	X0110058	68	M	16/01/2013	HGT	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
10	5	X0110058	68	M	16/01/2013	HGT	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
11	6	X0205019	61	M	08/02/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
12	6	X0205019	61	M	08/02/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
13	7	X0319310	54	M	23/03/2013	HGT	HEMOC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
14	7	X0319310	54	M	23/03/2013	HGT	HEMOC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
15	8	3637	26	M	04/05/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
16	8	3637	26	M	04/05/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
17	9	X0430105	91	F	11/05/2013	COMMUNAUTAIRE	HEMOC	<i>O.anthropi</i>	
18	9	X0430105	91	F	11/05/2013	COMMUNAUTAIRE	HEMOC	<i>O.anthropi</i>	
19	10	x0607011	78	M	14/06/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Sphin.thalp</i>	
20	10	x0607011	78	M	14/06/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Sphin.thalp</i>	
21	11	X0719040	79	M	24/06/2013	H DE KATI	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
22	11	X0719040	79	M	24/06/2013	H DE KATI	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
23	12	X1021068	30	M	24/10/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
24	12	X1021068	30	M	24/10/2013	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
25	13	X1223072	44	M	30/12/2013	CENTR LUTTE DIABETE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
26	13	X1223072	44	M	30/12/2013	CENTR LUTTE DIABETE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
27	14	Y0107065	19	M	13/01/2014	H DE KATI	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
28	14	Y0107065	19	M	13/01/2014	H DE KATI	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
29	15	Y0407041	92	M	10/04/2014	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
30	15	Y0407041	92	M	10/04/2014	COMMUNAUTAIRE	URINE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
31	16	Y0522092	38	F	27/05/2014	CENTR LUTTE DIABETE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK
32	16	Y0522092	38	F	27/05/2014	CENTR LUTTE DIABETE	PUS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BLSE/VITEK

Le n° de la souche correspond au 3 premiers lettres et chiffres de CODAT+ 2 lettres de la souche+ le numero d'ordre. EX: W12PAE20 (20ème *Pseudomonas aeruginosa* isolé en Decembre,2012)

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 des 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

