

MINISTERE DE L'EDUCATION NATIONALE

UNIVERSITE DE BAMAKO

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE
ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple – Un But – Une Foi

ANNEE UNIVERSITAIRE 2004 – 2005

N° _____ /

**CARACTERES BACTERIOLOGIQUES ET PLACE
DE *STREPTOCOCCUS pneumoniae* DANS LES
INFECTIONS BACTERIENNES INVASIVES CHEZ
LES ENFANTS HOSPITALISES DANS LE
SERVICE DE PEDIATRIE DE L'HOPITAL
GABRIEL TOURE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le __ / __ / 2005
Devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie

Par M^{lle} MARIKO Ramata

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

JURY

Président du Jury : - Professeur DIALLO Amadou
Membres : - Docteur SOW Samba
- Docteur KEITA Tatiana
Co-directeur de thèse : - Docteur DIALLO Souleymane
Directeur de thèse : - Professeur BOUGOUDOGO Flabou

ADMINISTRATION

DOYEN : **MOUSSA TRAORE** - PROFESSEUR

1^{ER} ASSESSEUR : **MASSA SANOGO** - MAITRE DE CONFERENCES

2^{EME} ASSESSEUR : **GANGALY DIALLO** - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

SECRETAIRE PRINCIPAL : **YENIMEGUE ALBERT DEMBELE** - MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

AGENT COMPTABLE : **Madame COULIBALY Fatoumata TALL** - CONTROLEUR DE TRESOR

LES PROFESSEURS HONORAIRES

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

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT PAR D.E.R. & PAR GRADE

D.E.R. CHIRURGIE ET SPECIALITES CHIRURGICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdel Karim KOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Sambou SOUMARE	Chirurgie Générale
Mr Abdou Alassane TOURE	Orthopédie-Traumatologie, Chef de D.E.R.
Mr Kalilou OUATTARA	Urologie
Mr Amadou DOLO	Gynéco-Obstétrique
Mr Alhousseini Ag MOHAMED	ORL

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Abdoulaye DIALLO	Ophtalmologie
Mr Djibril SANGARE	Chirurgie Générale
Mr Abdel Kader TRAORE Dit DIOP	Chirurgie Générale
Mr Abdoulaye DIALLO	Anesthésie - Réanimation
Mr Gangaly DIALLO	Chirurgie Viscérale
Mr. Mamadou TRAORE	Gynéco-Obstétrique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mme SY Aïda SOW	Gynéco-Obstétrique
-----------------	--------------------

Mr Salif DIAKITE

Gynéco-Obstétrique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mme DIALLO Fatimata S. DIABATE

Gynéco-Obstétrique

Mr Sadio YENA

Chirurgie Générale

Mr Filifing SISSOKO

Chirurgie Générale

Mr Issa DIARRA

Gynéco-obstétrique

Mr Youssouf COULIBALY

Anesthésie - Réanimation

Mr Samba Karim TIMBO

ORL

Mme TOGOLA Fanta KONIPO

ORL

5. ASSISTANTS CHEF DE CLINIQUE

Mme Djénéba DOUMBIA

Anesthésie/Réanimation

Mr Mamadou L. DIOMBANA

Stomatologie

Mr Sékou SIDIBE

Orthopédie. Traumatologie

Mr Abdoulaye DIALLO

Anesthésie - Réanimation

Mr Tiéman COULIBALY

Orthopédie Traumatologie

Mme TRAORE J. THOMAS

Ophtalmologie

Mr Nouhoum ONGOIBA

Anatomie & Chirurgie Générale

Mr Zanafon OUATTARA

Urologie

Mr Zimogo Zié SANOGO

Chirurgie Générale

Mr Adama SANGARE

Orthopédie - Traumatologie

Mr Sanoussi BAMANI

Ophtalmologie

Mr Doulaye SACKO

Ophtalmologie

Mr Ibrahim ALWATA

Orthopédie – Traumatologie

Mr Lamine TRAORE

Ophtalmologie

Mr Mady MAKALOU

Orthopédie/Traumatologie

Mr Aly TEMBELY

Urologie

Mr Niani MOUNKORO

Gynécologie/Obstétrique

Mr Tiemoko D. COULIBALY

Odontologie

Mr Souleymane TOGORA

Odontologie

Mr Mohamed KEITA

ORL

D.E.R. DE SCIENCES FONDAMENTALES

1. PROFESSEURS

Mr Daouda DIALLO

Chimie Générale & Minérale

Mr Siné BAYO

Anatomie-Pathologie-

Histoembryologie

Mr Amadou DIALLO

Biologie

Mr Moussa HARAMA

Chimie Organique

Mr Ogobara DOUMBO

Parasitologie – Mycologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

Mr Yénimégué Albert DEMBELE
Mr Anatole TOUNKARA
Mr Amadou TOURE
Mr. Flabou Bougoudogo
Mr Amagana DOLO

Chimie Organique
Immunologie **Chef de D.E.R.**
Histoembryologie
Bactériologie-Virologie
Parasitologie-Mycologie

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Bakary M. CISSE
Mr Abdrahamane S. MAIGA
Mr Adama DIARRA
Mr Mamadou KONE
Mr.Massa SANOGO

Biochimie
Parasitologie
Physiologie
Physiologie
Chimie Analytique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mahamadou CISSE
Mr Sékou F.M. TRAORE
Mr Abdoulaye DABO
Mr Abdrahamane TOUNKARA
Mr Ibrahim I. MAIGA
Mr Benoît KOUMARE
Mr Moussa Issa DIARRA
Mr Kaourou DOUCOURE
Mr Bouréma KOURIB
Mr Souleymane DALLO
Mr Cheik Bougadari TRAORE
Mr Lassana DOUMBIA

Biologie
Entomologie médicale
Malacologie, Biologie Animale
Biochimie
Bactériologie - Virologie
Chimie Analytique
Biophysique
Biologie
Immunologie
Bactériologie-Virologie
Anatomie-Pathologie
Chimie Organique

5. ASSISTANTS

Mr Mounirou BABY
Mr Mahamadou A. THERA
Mr Mangara M. BAGAYOGO
Mr Guimogo DOLO
Mr Abdoulaye TOURE
Mr Djibril SANGARE
Mr Mouctar DIALLO
Mr Boubacar TRAORE
Mr Bokary SACKO

Hématologie
Parasitologie-Mycologie
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Entomologie Moléculaire Médicale
Biologie Parasitologie
Immunologie
Biochimie

D.E.R. DE MEDECINE ET SPECIALITES MEDICALES

1. PROFESSEURS

Mr Abdoulaye Ag RHALY
Mr Mamadou K. TOURE
Mr Mahamane MAIGA
Mr Baba KOUMARE
Mr Moussa TRAORE

Médecine Interne
Cardiologie
Néphrologie
Psychiatrie, **Chef de DER**
Neurologie

Mr Issa TRAORE
Mr Mamadou M. KEITA
Mr Hamar A. TRAORE
Mr Dapa Aly DIALLO
Mr Moussa Y. MAIGA

Radiologie
Pédiatrie
Médecine Interne
Hématologie
Gastro-entérologie

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Toumani SIDIBE
Mr Bah KEITA
Mr Boubacar DIALLO
Mr Somita KEITA
Mr Abdel Kader TRAORE
Mr Siaka SIDIBE
Mr Mamadou DEMBELE

Pédiatrie
Pneumo-Phtisiologie
Cardiologie
Dermato-Léprologie
Médecine Interne
Radiologie
Médecine Interne

3. MAITRES ASSISTANTS

Mr Mamady KANE
Mme Tatiana KEITA
Mme TRAORE Mariam SYLLA
Mr Adama D. KEITA
Mme SIDIBE Assa TRAORE
Mme Habibatou DIAWARA

Radiologie
Pédiatrie
Pédiatrie
Radiologie
Endocrinologie
Dermatologie

4. ASSISTANTS CHEFS DE CLINIQUE

Mr Bou DIAKITE
Mr Bougouzié SANOGO
Mr Saharé FONGORO
Mr Bakoroba COULIBALY
Mr Kassoum SANOGO
Mr Seydou DIAKITE
Mme Habibatou DIAWARA
Mr Mahamadou B. CISSE
Mr Arouna TOGORA
Mme DIARRA Assétou SOUCKO
Mr boubacar TOGO
Mr Mahamadou TOURE
Mr Idrissa A. CISSE
Mr Mamadou B. DIARRA
Mr Anselme KONATE
Mr Moussa t. DIARRA
Mr souleymane DIALLO
MrSouleymane COULIBALY
Mr Daouda K. MINTA
Mr Sounkalo DAO

Psychiatrie
Gastro-entérologie
Néphrologie
Psychiatrie
Cardiologie
Cardiologie
Dermatologie
Pédiatrie
Psychiatrie
Médecine Interne
Pédiatrie
Radiologie
Dermatologie
Cardiologie
Hépatogastro-entérologie
Hépatogastro-entérologie
Pneumologie
Psychologie
Maladies Infectieuses
Maladies Infectieuses

5. ASSISTANT

Mr Cheick Oumar GUINTO

Neurologie

D.E.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEUR

Mr Boubacar Sidiki CISSE
Mr Gaoussou KANOUTE

Toxicologie
Chimie Analytique, **Chef de D.E.R.**

2. MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Mr Ousmane DOUMBIA
Mr Drissa DIALLO

Pharmacie Chimique
Matières Médicales

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Boulkassoum HAIDARA
Mr Elimane MARIKO

Législation
Pharmacologie

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Alou KEITA
Mr Ababacar I. MAIGA
Mr Yaya KANE

Galénique
Toxicologie
Galénique

D.E.R. DE SANTE PUBLIQUE

1. PROFESSEUR

Mr Sidi Yaya SIMAGA

Santé Publique, **Chef de D.E.R.**

2. MAITRE DE CONFERENCES AGREGE

Mr Moussa A. MAIGA

Santé Publique

3. MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sanoussi KONATE

Santé Publique

4. MAITRES ASSISTANTS

Mr Bocar G. TOURE
Mr Adama DIAWARA
Mr Hamadoun SANGHO

Santé Publique
Santé Publique
Santé Publique

Mr Massambou SACKO

Santé Publique

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

Mr alassane A. DICKO

Santé Publique

5. ASSISTANTS

Mr Samba DIOP

Mr seydou DOUMBIA

Mr Oumar THIERO

Anthropologie Médicale

Epidémiologie

Bio statistique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

Mr N'Golo DIARRA

Mr Bouba DIARRA

Mr Salikou SANOGO

Mr Boubacar KANTE

Mr Souléymanne GUINDO

Mme DEMBELE Sira DIARRA

Mr Modibo DIARRA

Mme MAIGA Fatoumata SOKONA

Mr Mahamadou TRAORE

Mr Yaya COULIBALY

Botanique

Bactériologie

Physique

Galénique

Gestion

Mathématiques

Nutrition

Hygiène du Milieu

Génétique

Législation

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr. Doudou BA

Pr. Babacar FAYE

Pr. Eric PICHARD

Pr. Mounirou CISSE

Pr. Amadou Papa DIOP

Bromatologie

Pharmacodynamie

Pathologie Infectieuse

Hydrologie

Biochimie

ABREVIATIONS ET SIGLES

ATCC : American Type Culture Collection

B : acte Biologique

BGN : Bacille Gram Négatif

BGP : Bacille Gram Positif

C₃ : Fraction C₃ du complément

CGP : Cocci Gram Positif

CGPgr : Cocci Gram Positif en grappe

CGPch : Cocci Gram Positif en chaine

CGPpr : Cocci Gram Positif en paire

CIE : Contre- Immuno- Electrophorèse

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : dioxyde de carbone

Cocco BGN : Cocco Bacille Gram Négatif

CVD : Centre pour les Vaccins en Developpement

DCGN : Diplocoque Gram Négatif

H₂O₂ : Peroxyde d' Hydrogène

HGT : Hôpital Gabriel TOURE

INF α : Interferon Alpha

INRSP : Institut National de recherche en Santé Publique

IL- 1 : Interleukine 1

IM : Intra- Musculaire

LCR : Liquide Céphalo- Rachidien

mg/L : Milligramme par Litre

mm : Milli Mètre

NCTC : National Collection of Type Cultures

ORL : Oto- Rhino- Laryngologie

PEV : Programme Elargi de Vaccination

PLP : Proteine Liant les Pénicillines

S Ig A : immunoglobuline A sécrétoire

SIBI : Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive

Souche S : Souche Smooth

Souche R : Souche Rought

SC : Sous- Cutanée

µg : Micro- Gramme

PLAN

INTRODUCTION

OBJECTIFS

1. GENERALITES

1. 1. Historique

1. 2. Aperçu sur les streptocoques

1. 3. *STREPTOCOCCUS pneumoniae*

2. METHODOLOGIE

3. RESULTATS

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RESUME

ANNEXE

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
OBJECTIFS	4
1. GENERALITES	
1. 1. Historique	5
1. 2. Aperçu sur les streptocoques	6
1. 3. <i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	10
1. 3. 1. Définition	10
1. 3. 2. Habitat	10
1. 3. 3. Physiopathologie	13
1. 3. 4. Pouvoir pathogène	14
1. 3. 5. Facteurs de pathogénicité	14
1. 3. 5. 1. Capsule	15
1. 3. 5. 2. Pneumolysine	18
1. 3. 6. Caractères bactériologiques	18
1. 3. 6.1. Morphologie	18
1. 3. 6. 2. Caractères cultureux	19
1. 3. 6. 2. 1. Milieux liquides	22
1. 3. 6. 2. 1. Milieux solides	22
1. 3. 7. Caractères Biochimiques	25
1. 3. 8. Diagnostic biologique	26
1. 3. 8. 1. Diagnostic direct	26
1. 3. 8. 1. 1. Prélèvements	26
1. 3. 8. 1. 2. Examens microscopiques	26
1. 3. 8. 1. 3. Culture	26

1. 3. 8. 1. 4. Recherche des antigènes solubles -----	27
1. 3. 8. 1. 5. Sensibilité à l'Optochine -----	27
1. 3. 8. 1. 6. Lyse par les sels biliaires -----	30
1. 3. 8. 1. 6. 1. Phénomène de Neufeld -----	30
1. 3. 8. 1. 6. 2. Test de solubilité par les sels biliaires -----	30
1. 3. 8. 1. 7. Mise en évidence de la capsule -----	32
1. 3. 8. 2. Diagnostic indirect -----	32
1. 3. 9. Traitement -----	32
1. 3. 9. 1. Traitement curatif -----	32
1. 3. 9. 2. Traitement préventif -----	33
1. 3. 9. 3. Vaccins antipneumococciques -----	33
1. 3. 9. 3.1. Composition -----	33
1. 3. 9. 3. 2. Efficacité immunologique du vaccin -----	34
1. 3. 10. Sensibilité des pneumocoques aux antibiotiques -----	35
1. 3. 10. 1. Technique de l'antibiogramme pour le pneumocoque -----	35
1. 3. 10. 2. Lecture de l'antibiogramme -----	36
1. 3. 10. 3 . Technique d'E- test -----	37
1. 3. 11. Epidémiologie -----	40

2. METHODOLOGIE

2. 1. Présentation de la méthode -----	43
2. 2. Cadre d'étude -----	44
2. 3. L'étude -----	46
2. 3 .1. Type d'étude -----	46
2. 2. 2. Durée de l'étude -----	47
2. 3. 3. Critères d'inclusion et de non- inclusion -----	47

2. 3. 3. 1. Critères d'inclusion -----	47
2. 3. 3. 2. Critères de non- inclusion -----	47
2. 4. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides biologiques -----	48
2. 4. 1. Traitement des prélèvements de LCR -----	48
2. 4. 2 Traitement des autres liquides biologiques-----	49
2. 4. 3. Protocole de travail de la Culture du LCR et des autres liquides biologiques -----	50
2. 5. Protocole de Technique des hémocultures positives -----	50
2. 6. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries -----	54
2. 6. 1. Coloration de Gram -----	54
2. 6. 2. Tests biochimiques et métaboliques -----	58
2. 6. 2. 1. Observation de la réaction d'Hémolyse -----	58
2. 6. 2. 2. Catalase -----	59
2. 6. 2. 3. Test à l'Optochine -----	61
2. 6. 3. Tests immunologiques -----	62
2. 6. 4. Test de Sensibilité aux antibiotiques -----	64
2. 6. 5. Sérotypage des souches de <i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i> --	71
2. 7. Conservation des cultures pures -----	71
2. 8. Eléments de l'assurance qualité-----	73

3. RESULTATS

3. 1. Fréquence des prélèvements -----	77
3. 2. Germes identifiés à partir des prélèvements -----	79
3. 3. Profil antibiotique des souches de <i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	92
3. 4. Résultat du typage des souches de <i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i> -	93
3. 5. Répartition saisonnière des cas de <i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	95

4. COMMENTAIRES ET DISCUSSION -----	98
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS -----	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	06
RESUME -----	109
ANNEXES -----	115

DEDICACES

Je commence tout d'abord par rendre grâce à DIEU, LE CLEMENT, LE MISERICORDIEUX, qui m'a donné la santé, la force et les moyens nécessaires pour mener à terme ce travail. Que Sa Bénédiction et Sa Protection accompagnent tous nos actes dans ce monde ici bas. Amen.

Je rends également grâce au dernier des Prophètes, MOHAMED, Louanges et Paix sur Lui, Sa Famille et ses Compagnons. Amen.

A mon père Brahima MARIKO,

pour son sens élevé du devoir, son goût pour le travail bien fait et sa disponibilité à donner une bonne éducation à ses enfants. Homme de foi, il a ouvert sa porte aux parents et amis pour le renforcement de la solidarité parentale. Il nous a toujours conseillé dans le bon sens et nous a assisté moralement, matériellement et financièrement.

A ma mère Aminata SAMAKE,

mère sensible au devenir de ses enfants, courageuse, attentive à tout ce qui se passe dans la famille, elle a su éduquer ses enfants dans le sens de l'honneur et du respect de l'autre. D'un franc parler, ses conseils, son appui moral, matériel et financier ne nous ont jamais fait défaut.

A mes oncles et tantes,

pour les conseils et l'assistance dont j'ai toujours bénéficié de leur part.

A mes frères et sœurs, cousins et cousines,

que j'invite au travail qui, seul libère l'être humain et le rend indépendant des autres ; à l'entente et à la concorde pour consolider l'unité familiale et renforcer les liens fraternels.

A mon fiancé Ousmane TRAORE,

pour son soutien et son encouragement, que DIEU nous donne une longue vie pour que nous puissions vivre dans la paix et la joie.

A tous les Médecins et Pharmaciens du monde,

je leur dédie ce modeste travail en les invitant à conjuguer leurs efforts pour lutter efficacement contre les maladies et toutes les maladies

REMERCIEMENTS

Nos sincères remerciements :

Aux familles de :

Soly KONE à Sogoniko ;

Sinsé BAGAYOKO à Boulkassoumbougou ;

Emmanuel KONATE à Kati ;

Sékouba DOUMBIA à Torokorobougou ;

Salif SISSOKO à Moribabougou ;

Modibo HAIDARA à Kalabancoro ;

Ousmane SAMAKE à Ouaguadougou.

A nos partenaires Américains :

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

Au Docteur Samba O. SOW, MD, MSc coordinateur CVD- Mali et tout le personnel du CVD.

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation depuis le cycle fondamental jusqu'au cycle supérieur.

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

A tout le personnel de l'Hôpital Gabriel TOURE et plus particulièrement au personnel du Laboratoire d'Analyses Médicales.

A tous les étudiants (es) de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto -Stomatologie et particulièrement à notre promotion en souvenir des dures années de labeur passées ensemble.

A mes amis (es) et à toutes les personnes de bonne volonté qui de près ou de loin n'ont ménagé aucun effort pour m'accompagner dans la réalisation de ce travail qui m'ouvrira les portes sur la vie professionnelle.

AUX MEMBRES DU JURY

➤ A notre Maître et président de jury :

Professeur Amadou DIALLO.

Professeur de zoologie à la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odonto- Stomatologie du Mali.

Vice Recteur de l'Université de Bamako.

Cher Maître vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

La clarté de votre enseignement, vos qualités humaines, sociales et scientifiques font de vous un Maître respectable et admiré. Votre souci constant pour l'amélioration de la qualité de l'enseignement de la Pharmacie et votre engagement pour la valorisation de la profession de Pharmacie au Mali, sont remarquables de tous. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail et vos qualités d'homme de science, de culture, font de vous un exemple à suivre.

Veillez accepter cher Maître, nos sincères remerciements.

➤ A notre Maître et juge

Docteur KEITA Tatiana

Assistante chef de clinique en Pédiatrie à la FMPOS.

C'est un honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans ce jury de thèse malgré vos multiples occupations.

Votre disponibilité et votre simplicité nous ont beaucoup impressionnés.

La courtoisie et l'esprit de collaboration qui vous animent nous ont beaucoup marqué.

Nous vous prions d'accepter nos sentiments de sincère reconnaissance et de profond respect.

➤ A notre Maître et juge

Docteur Samba Ousmane SOW

Spécialiste en Léprologie, Epidémiologiste des pathologies infectieuses

Chef de l'Unité Léprologie du CNAM

Coordinateur du Centre pour le Développement des Vaccins (CVD- Mali).

Honorable Maître, c'est un réel plaisir et un honneur pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse. Votre rigueur et votre simplicité ont été toujours à la disposition de la jeune génération pour le bien-être de la santé. Votre désir à transmettre aux autres, vos larges connaissances font de vous un homme de science apprécié.

Nous apprécions grandement votre dynamisme et votre générosité.

➤ A notre Maître et co- directeur

Docteur Souleymane DIALLO

Maître Assistant en bactériologie et Virologie à la FMPOS.

Chef de service du laboratoire de l’Hôpital Gabriel TOURE.

Lieutenant – Colonel des forces Armés du Mali.

Cher Maître, vous nous aviez fait honneur en nous acceptant dans votre service. Au delà de vos qualités de Pédagogue reconnues par tous ; nous avons découvert un homme plein de générosité, rigoureux dans le travail dont l'esprit scientifique ne cessera jamais d'émerveiller tant vos collaborateurs que vos étudiants. Nous sommes très honorés d'être parmi vos élèves.

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

➤ **A notre Maître et Directeur de thèse**
Professeur Flabou BOUGOUDOGO
Maître de conférence agrégé en Bactériologie et Virologie à la
FMPOS.
Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé
Publique
Responsable des cours de bactériologie et virologie à la
FMPOS.

Vous nous avez fait confiance en acceptant de nous guider dans la réalisation de ce travail qui est d'ailleurs le votre. Nous avons bénéficié de vos qualités pédagogiques et humaines. Vos remarques et suggestions ont sans doute contribué à l'amélioration de la qualité de ce travail.

Nous gardons de vous l'image d'un grand homme qui a su allier avec bonheur, rigueur et respect de l'humain dans l'exercice de la médecine.

Permettez- nous cher Maître, de vous exprimer à travers ce travail tout notre respect et notre profonde gratitude.

INTRODUCTION

La mortalité infantile attribuable aux maladies infectieuses reste une préoccupation majeure de santé publique, bien que nous disposons actuellement de moyens de prévention et de traitements efficace.^[21]

En dehors des périodes épidémiques, les cas de méningites purulentes sont dûs en plus de *NEISSERIA meningitidis*, à deux autres germes qui sont *STREPTOCOCCUS pneumoniae* et *HAEMOPHILUS influenzae* type b. Ces deux derniers germes sont actuellement plus fréquents que *NEISSERIA meningitidis*.^[14]

STREPTOCOCCUS pneumoniae infecte les voies respiratoires, le sang, les méninges et d'autres sites anatomiques chez l'enfant et l'adulte. La prévention des maladies pneumococciques invasives chez l'enfant est un problème global et prioritaire de santé publique à cause de la forte fièvre de la maladie et la bactérie devenant de plus en plus résistante aux antibiotiques les plus couramment utilisés. Le moyen le plus prometteur de prévention est l'introduction universelle de la vaccination chez l'enfant.^[11]

Parmi les infections bactériennes, celle à *STREPTOCOCCUS pneumoniae* demeure un problème, surtout dans les pays en voie de développement où la couverture vaccinale reste basse. Ces infections sont toujours préoccupantes de par la pathogénicité et le taux de mortalité qui leur sont attribuées.

En effet, *STREPTOCOCCUS pneumoniae* représente une cause importante de morbidité et de mortalité en pathologie infectieuse pédiatrique et occupe actuellement la première place des infections bactériennes invasives chez les enfants de 3 mois à 2 ans.^[21]

STREPTOCOCCUS pneumoniae est l'une des causes majeures de pneumonies et de méningites bactériennes.^[7]

Selon l'OMS le pneumocoque est responsable d'infections bactériennes graves chez les enfants. Le taux de mortalité liée à cette infection est de 1,7 pour 100.000 chez les moins de 2 ans et de 5 pour 100.000 chez les plus de 65 ans.^[21]

Responsable de plus de 50 % des pneumonies, de 20 % de méningites bactériennes et de 10 % de septicémies, le pneumocoque n'a pas disparu de la pathologie. Il frappe à tout âge et plus volontiers les sujets fragilisés par une pathologie sous-jacente ou par une diminution physiologique de leur défense, comme les vieillards. Il tue dans 20 % des cas de pneumonies, 30 % des cas de méningites, 20 à 60 % des cas de septicémies et représente aux U.S.A. la première cause de mortalité par maladies infectieuses.^[23]

En Afrique subsaharienne, les épidémies de méningite à *NEISSERIA meningitidis* qui sévissent régulièrement masquent certains aspects de l'épidémiologie des méningites bactériennes du jeune enfant. En effet, les méningites de l'enfant, surtout des moins de 1 an, ont des manifestations cliniques polymorphes, ce qui rend leur diagnostic difficile. Les germes les plus fréquemment rencontrés sont *STREPTOCOCCUS pneumoniae* et *HAEMOPHILUS influenzae* type b, deux germes fragiles donnant souvent des Liquides -Céphalo-Rachidien (LCR) troubles à culture stérile.^[13]

STREPTOCOCCUS pneumoniae est responsable de 250.000 à 400.000 décès par an en Afrique subsaharienne.^[25]

La collaboration avec le «Center for Vaccine Development» (CVD) de l'Université de Maryland Baltimore aux Etats Unis, a permis la mise sur

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

piéd d'un laboratoire de bactériologie moderne permettant d'effectuer le diagnostic de cette infection à l'hôpital Gabriel TOURE. Elle est une opportunité pour mesurer l'ampleur de la morbidité et de la mortalité réelles des maladies bactériennes invasives dues à *STREPTOCOCCUS pneumoniae*. Les résultats de cette étude permettront à long terme, de connaître les sérotypes de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, leur profil antibiotique pour une meilleure thérapie et, surtout, de montrer l'opportunité de la prophylaxie par la vaccination.

Cette thèse est réalisée dans le cadre de l'étude du Centre pour le Développement des Vaccins du Mali (CVD- MALI) menée dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE et a couvert la période de Novembre 2003 à Octobre 2004.

Notre étude a porté sur le diagnostic bactériologique des liquides biologiques reçus de la pédiatrie.

OBJECTIFS

Objectif général

Etudier les caractères bactériologiques et la place de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les infections bactériennes invasives en milieu pédiatrique à partir des liquides biologiques examinés au laboratoire de l'hôpital Gabriel TOURE.

Objectifs spécifiques

- Identifier les germes dans les prélèvements des différents liquides biologiques des sites stériles ;
- Déterminer le profil de la sensibilité aux antibiotiques de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* par rapport aux antibiotiques couramment utilisés ;
- Décrire la répartition saisonnière de l'isolement de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les différents prélèvements étudiés ;
- Identifier les sérotypes de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* responsables d'infections invasives en pédiatrie à l'hôpital Gabriel TOURE.

1. GENERALITES

1. Historique

Le nom de *STREPTOCOCCUS* (*streptus*, flexible ; *coccus*, grain) fut, pour la première fois, attribué par Billoth et Ehrlich (1877) à des coques formant des chaînettes observées dans les blessures infectées. Fehleisen (1883) décrivit un coque similaire comme agent de l'érysipèle. Rosenbach (1884) donna le nom de *STREPTOCOCCUS pyogenes* à des coques groupés en chaînettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme. Pasteur, Chamberland et Roux (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez des lapins inoculés avec de la salive humaine. Cette expérience est considérée comme la première référence sur *STREPTOCOCCUS pneumoniae*. La description de cette espèce fut réalisée par Fraenkel et Weichselbaum (1886).^[19]

Isolé de la salive en 1880 par Pasteur, le *STREPTOCOCCUS pneumoniae* occupe la première place parmi les causes de mortalité par maladies infectieuses dans les pays développés. La découverte en 1910 des différents types sérologiques de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* avait permis l'emploi d'antisérums spécifiques qui furent le premier traitement efficace de la pneumonie à pneumocoque.

L'étude de la physiologie de cette bactérie a conduit à des découvertes capitales qui ont ouvert la voie à la biologie moléculaire. En 1928, Griffith a montré qu'une souche R (rough) non capsulée et non pathogène pour la souris de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* pouvait être transformée en une souche S (smooth) capsulée et pathogène. En 1944, Avery, MacLeod et

Mac Cathy établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques.^[1]

Lancefield décrit en 1933 les groupes sérologiques de A à F.^[16] Parmi les groupes antigéniques que Lancefield désigne par des lettres (de A à H, et de K à V), les groupes A, B, C ou G caractérisent les espèces de streptocoques β -hémolytiques les plus pathogènes. Les streptocoques α -hémolytiques ou non hémolytiques appartiennent à d'autres groupes ou sont non groupables et sont habituellement commensaux.^[22]

En raison de son important pouvoir pathogène pour l'homme, le *STREPTOCOCCUS pneumoniae* a fait l'objet de nombreux travaux depuis la fin du 19^{ème} siècle.

L'étude de cette bactérie a permis de nombreuses découvertes concernant les mécanismes de pathogénicité, la réponse immunitaire à médiation humorale, les transferts génétiques.^[4]

2. Aperçu sur les streptocoques

Le genre *STREPTOCOCCUS*, un groupe hétérogène de bactéries Gram positifs, a une large signification dans la médecine et l'industrie. Les divers streptocoques sont écologiquement importants en tant qu'éléments de la flore microbienne normale des animaux et des humains ; certains peuvent également causer des maladies qui s'étendent de subaiguës à aiguës ou même à chroniques. Parmi les maladies humaines significatives attribuables aux streptocoques, les plus importantes sont la scarlatine, la maladie du cœur rhumatismale, la glomérulonéphrite et la pneumonie pneumococcale. Les streptocoques sont essentiels dans les processus industriels, de laiterie et comme indicateurs de pollution.^[26]

Les streptocoques appartenant au genre *STREPTOCOCCUS* qui sont des coques à Gram positifs. Les cellules sont ovoïdes, sphériques ou rarement allongées en bâtonnets, formant des chaînettes ou des paires (cf. fig.1). Ils sont dépourvus de cytochrome et de catalase. La fermentation des glucides est homo fermentative, l'acide lactique dextrogyre étant le principal produit final, sans formation de gaz. Ils sont exigeants en vitamines, acides aminés, purines et pyrimidines. Ils poussent sur milieux usuels enrichis de sang, sérum et/ou ascite. Les infections streptococciques, si diverses dans leurs manifestations cliniques, sont parmi les plus fréquentes et les plus sévères des infections bactériennes, en dépit des moyens thérapeutiques efficaces actuellement disponibles.^[19]

Les streptocoques ont un métabolisme anaérobie. Cependant la plupart des souches tolèrent l'oxygène et peuvent être cultivées *in vitro* en atmosphère aérobie. Ils sont exigeants en facteurs de croissance : le sang ajouté aux géloses permet leur multiplication *in vitro*. Cette multiplication (ou croissance) peut être favorisée par l'apport de CO₂ ou par une atmosphère anaérobie.^[22]

La nomenclature des streptocoques, particulièrement celle d'utilisation médicale, a été basée en grande partie sur l'identification de sérigraphies des composants de mur de cellules plutôt que sur des noms d'espèce. Pendant plusieurs décennies, l'intérêt s'est concentré sur deux espèces : *STREPTOCOCCUS pyogenes* (streptocoque du groupe A) et *STREPTOCOCCUS pneumoniae* (pneumocoque).^[26]

Les caractères morphologiques et métaboliques les distinguent des staphylocoques. Les entérocoques sont proches des streptocoques (même

morphologie et même métabolisme anaérobie), ils peuvent se multiplier sur des milieux de cultures ordinaires (non additionnés de sang).^[22]

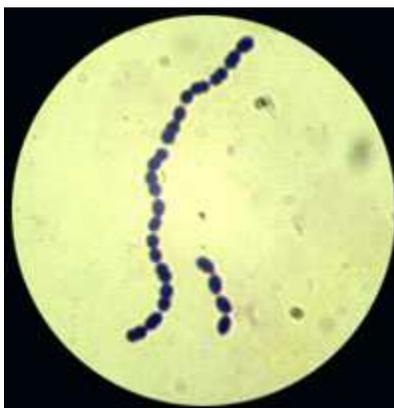


Figure 1 : Aspect des Streptocoques après coloration de Gram ^[22]

A la coloration de Gram on observe des *cocci* disposés en paires et en chaînettes.

La plupart des Streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou des téguments. La colonisation des muqueuses et des téguments par des Streptocoques est due à leur capacité d'adhésion spécifique aux cellules épithéliales de l'hôte. Par leur présence dans la flore normale, ils jouent un rôle important dans l'équilibre ecobactériologique et dans l'acquisition de l'immunité naturelle non spécifique. Cette flore commensale (Streptocoques oraux, Streptocoques des groupes B, C, D, G, L et *STREPTOCOCCUS pneumoniae*) peut devenir pathogène dans certaines circonstances particulières et être responsable d'un grand nombre d'infections streptococciques sévères.^[19]

3. *STREPTOCOCCUS pneumoniae*

3. 1. Définition

Le *STREPTOCOCCUS pneumoniae* est l'agent de la pneumonie franche lobaire aiguë, des septicémies et des suppurations. Il est localisé surtout au niveau de la sphère Oto-Rhino-Laryngologique (ORL).

La résistance aux antibiotiques est en extension. Sa sensibilité aux β -lactamines n'est plus la règle.^[16]

3. 2. Habitat

Le pneumocoque colonise fréquemment les voies respiratoires de l'Homme (cf. fig. 2). Le taux de colonisation est très élevé à l'école maternelle (40-60 %) puis diminue, il est de 6 % chez les adultes sans enfants et de 20 à 30 % chez les adultes avec enfants.^[1]

C'est un germe transmis par voie aérienne. La transmission est presque directe par l'intermédiaire des gouttelettes de Pflügge. Le germe, réputé fragile, survit peu dans le milieu extérieur.

C'est un germe essentiellement humain, il est très rarement isolé chez les animaux.^[1]

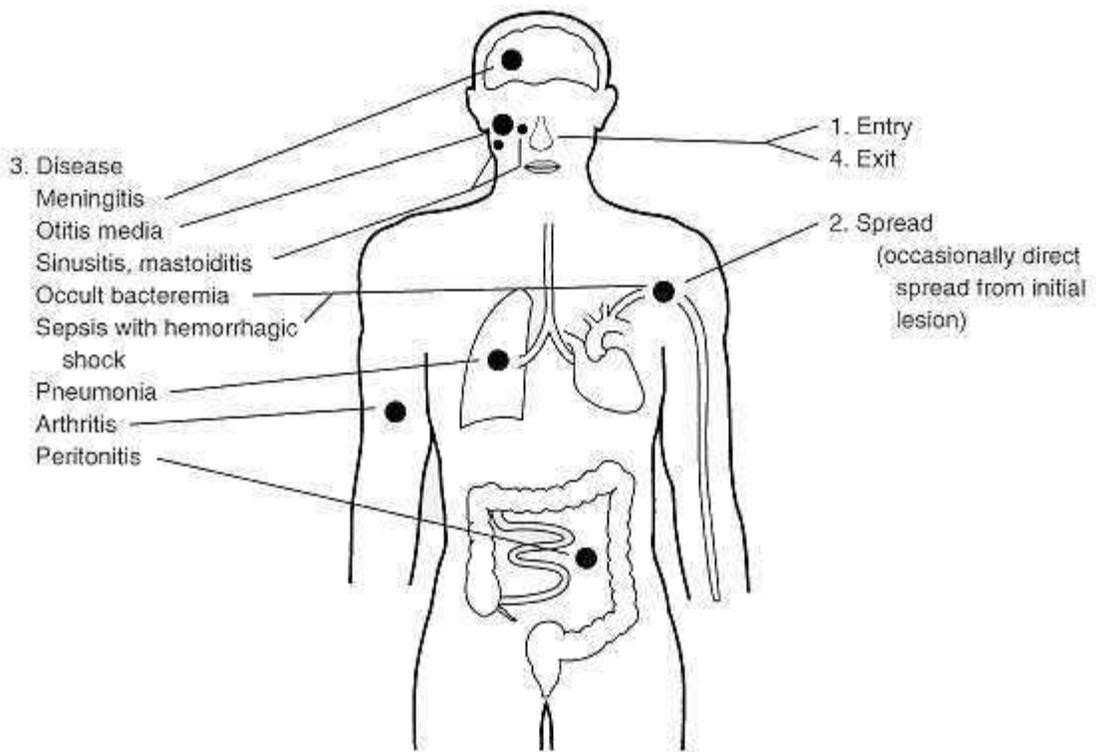


Figure 2 : Localisation des zones d'infections par *STREPTOCOCCUS pneumoniae* ^[26]

3. 3. Physiopathologie

Les découvertes de ces dernières années éclairent certains faits observés en pathologie infectieuse, mais ne règlent pas tout. Pendant longtemps, on a pensé que la capsule était responsable du pouvoir pathogène. La souche S capsulée tuait la souris, la souche R non capsulée était inoffensive. Ce n'est plus tout à fait exact. On peut avoir deux souches capsulées du sérotype 3 qui ont la même composition chimique du polysaccharide, l'une virulente l'autre non virulente pour la souris. La capsule n'est donc pas le seul support de virulence même si la capsule protège le *STREPTOCOCCUS pneumoniae* de la phagocytose.

La porte d'entrée est respiratoire. La première étape du processus infectieux est la colonisation de la muqueuse ciliée du rhinopharynx qui fait intervenir une adhesine protéique bactérienne. Une S Ig-A protéase bactérienne détruisant anticorps et mucus favoriserait la colonisation. Puis les bactéries peuvent gagner les alvéoles pulmonaires, leur capsule permettant de résister aux macrophages et aux surfactants. La libération de différents produits (pneumolysine, fragments de peptidoglycane, acides teichoïques...) par lyse bactérienne et la production de H₂O₂ permettent une production massive de cytotoxines. Les alvéoles sont congestives, œdémateuses, remplies de polynucléaires et sont rapidement obstruées par la fibrine en même temps que se produisent des lésions tissulaires. La dissémination sanguine est favorisée par la réaction inflammatoire due à l'activation du complément et à la libération massive de TNF α et IL-1. Cette bactérie peut entraîner des localisations métastatiques (méningées notamment) et un syndrome de coagulation intravasculaire disséminé, rapidement mortel.^[1]

3. 4. Pouvoir pathogène

Les pneumocoques sont isolés à partir de différents prélèvements : expectoration, liquide pleural, sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), ou autres suppurations, selon qu'ils provoquent une pneumonie, une pleurésie purulente, une septicémie, une méningite purulente, ou une autre suppuration, telles que les otites ou les sinusites.^[22]

Les infections respiratoires sont variées : pneumonies lobaires aiguës, broncho-pneumonies, bronchites et infections ORL comme les otites, sinusites, mastoïdites. Les infections neuroméningées représentent la deuxième cause des méningites bactériennes après *HAEMOPHILUS influenzae*. Les septicémies vont volontiers se compliquer de manifestations multiples, en particulier au niveau des séreuses : articulaires, péritonéales, péricardiques, méningées.^[16]

3. 5. Facteurs de pathogénicité

Le pouvoir pathogène des pneumocoques a été attribué à de nombreux facteurs de pathogénicité et plus de 125 gènes pourraient être impliqués dans la virulence. Les principaux facteurs de virulence peuvent être divisés en deux groupes :

- le premier groupe est constitué par des composants de surface (capsule, protéine A de surface, protéine liant le facteur H du système complémentaire, protéase active sur le composé C₃ du complément) qui jouent un rôle important au début de l'infection en inhibant la phagocytose. Cette inhibition de la phagocytose est, en grande partie, due à une inhibition de l'activation du système complémentaire ;

- le deuxième groupe rassemble des composants (polysaccharide lié au peptidoglycane, pneumolysine) qui interviennent à un stade plus tardif de l'infection et qui sont libérés à la suite d'une désintégration des cellules bactériennes provoquée principalement par l'autolysine. Ces facteurs de virulence provoquent d'intenses manifestations inflammatoires notamment à la suite de l'activation du système complémentaire.^[4]

3. 5. 1. La capsule

STREPTOCOCCUS pneumoniae possède une capsule de taille importante (cf. fig. 3). Les antigènes capsulaires appartiennent à différents serotypes, qui sont à la base de l'épidémiologie et de la préparation de vaccins anti-pneumococciques.

Trois antigènes pariétaux : les protéines R et M et un polysaccharide, la substance C, jouent un rôle minime en regard des propriétés liées à la capsule.

La capsule du pneumocoque, absente des formes R, de nature polysaccharidique, est le support principal de l'antigenicité des pneumocoques. A l'intérieur de l'espèce *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, la spécificité des antigènes capsulaires est très grande. Plus de 80 sérotypes sont connus. Toutefois, il peut exister des réactions croisées avec certains Streptocoques non groupables «Viridans». La présence d'une capsule bien développée est indispensable à une pleine virulence de la bactérie qu'elle protège de la phagocytose. Cette activité antiphagocytaire est neutralisée par les anticorps spécifiques de type capsulaire. Dans la maladie humaine, les anticorps apparaissent au 8^{ème} jour, lors de la crise pneumonique. Le type capsulaire est déterminé *in vitro* par des antisérums spécifiques entraînant

par la formation de l'immun-complexe, une impression de « gonflement de la capsule ». ^[2]

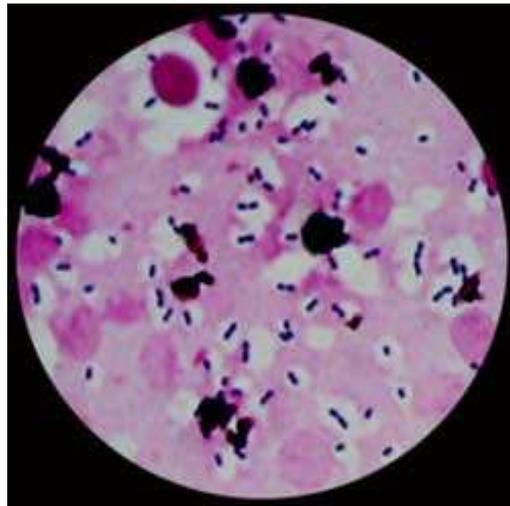


Figure 3 : Aspect de la capsule après coloration de Gram ^[22]

Un halot blanchâtre est observable autour des bactéries.

3. 5. 2. Pneumolysine

Responsable de l'hémolyse de type alpha, c'est une toxine oxygène sensible, activée par les groupements thiols, sensible au cholestérol, cytolytique, au même titre que la streptolysine O.

Elle semble très liée au corps bactérien et est libérée lors de la lyse de la bactérie.^[1]

3. 6. Caractères bactériologiques

3. 6. 1. Morphologie

A l'examen microscopique, le pneumocoque a un aspect en diplocoque, en flamme de bougie, en 8 et en courte chaînette. Les diplocoques et les chaînettes capsulées sont à Gram positif.

Cependant il faut savoir que l'aspect n'est pas toujours aussi évocateur. Par exemple, si l'environnement est carencé en magnésium, on peut observer des chaînettes relativement longues. Le même phénomène se produit en présence d'anticorps dirigés contre le sérotype capsulaire. Dans certains cas, si le malade est sous traitement, on peut voir des pneumocoques prendre des formes pseudobacillaires.

Dans certains produits pathologiques fibrineux et dans les cultures anciennes, le pneumocoque prend mal le Gram et peut apparaître à Gram négatif. Particulièrement belle après inoculation à la souris, la capsule est généralement visible dans les produits pathologiques, mais parfois plus discrets. La capsule est plus visible sur une préparation à l'encre de chine.

Quand les pneumocoques se multiplient intensément, on distingue mal les capsules ; ces polysaccharides capsulaires sont relargués dans le milieu, ils sont aussi libérés dans les produits pathologiques, d'où le terme d'exoantigènes solubles parfois utilisé pour les désigner.^[1]

Dans les conditions défavorables, il y a une tendance de plus en plus marquée à l'allongement des chaînes, avec perte de la capsule.

Le pneumocoque est Gram positif, mais se décolore très facilement et devient Gram négatif au cours du vieillissement.

La capsule est bien visible, soit après coloration négative (encre de chine, méthode de Burri), soit après coloration positive (méthode d'Antoly : le germe est bleu noir, la capsule violette). C'est un germe immobile.^[23]

3. 6. 2. Caractères cultureux

L'intervalle de température permettant la culture va de 25 à 42 °C. En routine, on cultive le germe entre 35 et 37 °C. Les cultures sont possibles pour des pH situés entre 6,5 et 8,3, le pH optimal étant de 7,8. Les pneumocoques en culture sont à une autolyse spontanée. Il conviendra donc de chercher à limiter cette autolyse.

Les milieux employés devront être riches, par exemple ; gélose + sang de mouton à 5 %. Sur ce milieu, le germe développe une hémolyse de type alpha, comme ses proches parents, les streptocoques verdissants. La culture est favorisée par une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂ (cf. fig. 4).

L'anaérobiose stricte est encore meilleure pour leur développement et on peut considérer que la gélose au sang placée en anaérobiose est un milieu sélectif qui favorise le pneumocoque.

A l'examen macroscopique, les colonies se présentent sous forme de petites colonies transparentes, rondes, de 0,5 à 1,5 mm de diamètre. Une ombilication au centre de la colonie correspond à un début d'autolyse.

Le sérotype 3 présente des colonies muqueuses d'un diamètre de 3 mm, semblables à celles des *KLEBSIELLA*. Cet aspect muqueux est dû à l'exubérance des capsules.

Dans les conditions d'anaérobiose stricte, les colonies sont bombées et de taille 2 à 3 fois supérieure à celles observées en aérobiose, et l'hémolyse n'apparaît pas. Par contre, si on abandonne la boîte 30 mn en atmosphère normale, une hémolyse alpha apparaîtra. En anaérobiose, en présence d'antibiotiques modifiant la paroi (pénicilline, vancomycine), il apparaîtra une hémolyse bêta.^[1]



Figure 4 : α - hémolyse de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* sur gélose au sang ^[22]

L'hémolyse α donne une coloration verdâtre à la gélose au sang.

3. 6. 2. 1. Milieux liquides

Sur bouillon ordinaire la culture est faible ; sur bouillon glucosé la culture est abondante, mais il y aura une tendance rapide à l'autolyse, d'où la mauvaise conservation du germe (ce phénomène est évité lorsque le germe est en phase R, puisqu'il n'y a pas d'autolyse).

3. 6. 2. 2. Milieux solides

Sur bouillon gélosé la culture est nulle.

Sur gélose additionné de sérum, on observe en 24 heures, l'apparition de petites colonies transparentes, « en goutte de rosée » à bords nets, ayant tendance à confluer (diamètre habituel : 5,5 à 1 mm en 24 heures) (cf. fig. 5). Plus les capsules sont grandes, plus les colonies sont grosses.

Sur gélose profonde, les colonies sont petites et sphériques sur toute la hauteur.

Sur gélose au sang, l'aspect est le même que sur gélose additionnée de sérum. On observe une hémolyse de type alpha (α) qui rappelle tout à fait l'hémolyse viridans. On a pu décrire une bêta (β) hémolyse sur gélose au sang de cheval, sous l'influence de certains antibiotiques (Methicilline).^[10]

Les streptocoques se multiplient sur gélose au sang sous forme de petites colonies "ombiliquées", l'aspect concave de leur surface résulte de la destruction des pneumocoques par une autolysine. Les cellules les plus vieilles de la colonie, situées à son sommet sont détruites, ce qui donne à la colonie un aspect en cratère. Certaines souches de pneumocoques secrètent une plus grande quantité de capsules, ce qui augmente la taille des colonies et leur donne un aspect muqueux.

Les pneumocoques sont classés parmi les streptocoques oraux (anciennement appelés streptocoques "viridans"). En effet, in vitro sur gélose au sang incubée en atmosphère aérobie ou enrichie en CO₂, on observe autour des colonies une hémolyse de type Alpha (α) (hémolyse incomplète à bords flous donnant à la gélose une couleur verdâtre). Cependant une hémolyse complète de type β est observée autour des colonies de pneumocoques dans certaines circonstances, notamment lorsque les cultures ont été faites en atmosphère anaérobie. Cette hémolyse est liée à la pneumolysine, ou hémolysine intra-cellulaire qui est détruite en présence d'oxygène.



A: sang



B : chocolat

Figure 5 : Aspect des colonies de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* sur les géloses ^[22]

Sur la gélose au sang, on observe une hémolyse de type (α) et sur la gélose au chocolat une pigmentation.

7. Caractères biochimiques

Le pneumocoque ne possède ni catalase, ni peroxydase, ce qui induit l'accumulation de peroxyde d'hydrogène responsable en partie de son autolyse. Les autres caractères sont :

- nitrate : négatif
- gélatine : négatif
- lait tournesolé : acidifié et coagulé,
- fermentation des sucres : acidification du gélose, du lactose, du raffinose, du saccharose...

Deux caractères sont plus intéressants :

- esculine : négatif
- inuline : négatif

Ces caractères ne sont guère recherchés pour l'identification du germe. L'inuline, par contre, a servi à différencier le pneumocoque des autres streptocoques. Mais un certain nombre de streptocoques viridans peuvent fermenter aussi l'inuline : *STREPTOCOCCUS salivarius*, *STREPTOCOCCUS sanguis*, *STREPTOCOCCUS uberis*.

L'identification formelle du pneumocoque repose en routine sur trois critères :

- la sensibilité à l'Optochine (éthylhydrocupréine, dérivé proche de la quinine), et en cas de doute ;
- la lyse par les selles biliaires ;

- la mise en évidence d'une capsule.

3. 8. Diagnostic biologique

3. 8. 1. diagnostic direct

L'isolement du germe est en général facile en l'absence de traitement préalable.

3. 8. 1. 1. Prélèvements

Les prélèvements à effectuer varient en fonction de la localisation de l'infection.^[6] L'examen des prélèvements de sang (hémoculture) ou des liquides de ponction (liquide céphalo-rachidien, liquide d'arthrite, liquide pleural ou liquide péricardique) permet facilement le diagnostic des infections métastatiques à pneumocoque, car le germe est alors isolé en culture pure.^[6]

3. 8. 1. 2. Examen microscopique

Il a une importance majeure, étant donné la morphologie souvent très caractéristique du pneumocoque : diplocoque à Gram positif, lancéolé, encapsulé.

3. 8. 1. 3. Culture

La culture sur milieu approprié enrichi, est aisée, tout en se rappelant qu'il s'agit d'un germe fragile, survivant peu de temps en dehors de l'organisme et très sensible aux températures inférieures à 37 °C.

3. 8. 1. 4. Recherche des antigènes solubles

L'électrosynérèse permet la mise en évidence des antigènes capsulaires solubles dans divers liquides biologiques, LCR, liquides pleuraux, sang et urines.^[3]

3. 8. 1. 5. Sensibilité à l'Optochine

(éthylhydrocupréine, dérivé proche de la quinine)

Sur une gélose au sang ensemencée en stries, un disque d'Optochine est déposé au début de l'isolement . Cette boîte est incubée pendant une nuit à une température de 35 °C dans une atmosphère enrichie en CO₂. Le résultat est donné en fonction du diamètre de la zone d'inhibition. (cf. fig. 6)

Pour un disque de 6 mm, le test est positif si la zone d'inhibition a un diamètre supérieur à 14 mm. Pour un disque de 10 mm, le test est positif si la zone d'inhibition a un diamètre supérieur à 16 mm. Si le diamètre de la zone d'inhibition est inférieur à 14 mm (disque de 6 mm) ou à 16 mm (disque de 10 mm), l'identification doit être confirmée par des tests complémentaires (solubilité dans la bile ou agglutination de particules de latex recouvertes d'anticorps spécifiques des 90 sérovars).^[4]

Des disques de 5 mm de diamètre sont chargés de 5 µg d'Optochine, dose calculée pour provoquer sur une culture de pneumocoques sur gélose au sang, une zone d'inhibition dont le diamètre est compris entre 12 et 35 mm. On peut lire sur les notices des fabricants que les Streptocoques, par contre, sont résistants à l'Optochine et se multiplient jusqu'au contact du disque. Cette distinction n'est pas toujours évidente. En fait, 0,5 à 5 % des pneumocoques sont résistants à l'optochine et quelques Streptocoques

verdissants sont inhibés par l'Optochine. Il convient donc de nuancer et de tenir compte du diamètre de la zone d'inhibition. La plupart des streptocoques en phase S (smooth) ou R (rough) ont une zone de diamètre supérieure à 15 - 20 mm. Pour un diamètre inférieur à 15 mm, il est nécessaire de pratiquer des tests complémentaires.^[15]



[5]



[22]

Figure 6 : Sensibilité de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* à l'Optochine

On observe aucune croissance tout autour du disque.

3. 8. 1. 6. Lyse par les selles biliaires

3. 8. 1. 6. 1. Phénomène de Neufeld

Ce test n'est généralement pratiqué que lorsque l'interprétation du test à l'Optochine est délicate.

Un volume de 0,5 ml d'une suspension en eau physiologique (opacité de 0,5 à 1 de l'échelle de McFarland) est mis dans deux tubes (13 sur 100 mm). Un autre volume de 0,5 ml d'une culture de 24 heures en bouillon de Todd-Hewitt ou en bouillon trypticase soja est réparti dans ces deux tubes. Une ou deux goutte (s) de rouge de phénol est (sont) ajoutée (s) à la solution qui est neutralisée par la soude 1 N. Puis 0,5 ml de desoxycholate de sodium à 2 % est mis dans l'un des tubes et dans l'autre 0,5 ml d'eau physiologique (tube témoin). Les tubes sont incubés à une température de 35 °C. Après ils seront examinés à partir de la deuxième heure de l'incubation. Une clarification du tube contenant le desoxycholate et une absence de clarification dans le tube témoin indiquent une réaction positive. Si la lyse est incomplète, il est nécessaire de recourir à des tests complémentaires.^[4]

3. 8. 1. 6. 2. Test de solubilité par les sels biliaires

L'examen de "bile solubility" est utilisé pour identifier le *STREPTOCOCCUS pneumoniae*. L'avantage de cet examen est qu'il peut être exécuté très rapidement (10-15 minutes) si la croissance est positive sur une gélose au sang. L'avantage du test de " bile solubility " est qu'il peut être exécuté au moment où des colonies ont poussé sur la gélose au sang.

Procédure

1. choisir une zone de la gélose de sang où la croissance paraît pure (c'est-à-dire, une croissance unique et isolée). La boîte de gélose de sang doit être utilisée pour ce test car elle permet une interprétation beaucoup plus facile du test ;
2. placer une goutte de la solution de bile (une solution à 10% de desoxycholate de sodium) sur la colonie ;
3. placer le couvercle sur la boîte de gélose et ne pas inverser la boîte de gélose ;
4. Après que la bile ait séché complètement (environ 10 minutes), examiner la plaque.

Interprétation

Réaction positive = les colonies seront dissoutes. Si la plaque est soigneusement examinée, les colonies seraient dissoutes (lysées). La surface de la gélose de sang sera Alpha- hémolytique (de la colonie) et Bêta hémolytique (de la bile). *Streptococcus pneumoniae* est positif pour le test de "bile solubility".

Réaction négative = les colonies ne seront pas dissoutes. La gélose de sang peut être lysée mais les colonies resteront intactes. Toute autre espèce de streptocoques est "bile solubility" négatif.

Un soin particulier doit être observé pour ne pas toucher à la gélose au sang pendant que la bile est sur la surface de la gélose. Si la boîte de pétri est

déplacée, les colonies bactériennes peuvent flotter loin et peuvent donner un faux positif.

Si l'un des examens, la " bile solubility " ou le test à l'Optochine est positif, l'organisme est identifié comme *STREPTOCOCCUS pneumoniae*.

3. 8. 1. 7. Mise en évidence de la capsule

Il faut disposer d'un sérum anti-pneumococcique polyvalent dirigé contre tous les types capsulaires. La réaction peut s'effectuer soit à partir des cultures, soit à partir des produits pathologiques.

L'antigène capsulaire peut- être révélé par « gonflement » des streptocoques capsulaires si les cocci sont visibles, soit par la technique immunologique telle que la contre -immuno- électrophorèse (CIE) ou la technique d'agglutination.^[1]

3. 8. 2. Diagnostic indirect

Il n'existe pas de diagnostic indirect de l'infection par la recherche des anticorps ; mais la mise en évidence d'anticorps permet de contrôler l'efficacité des vaccins.

3. 9. Traitement

3. 9. 1. Traitement curatif

Le pneumocoque se comporte vis-à-vis des antibiotiques comme le Streptocoque du groupe A. Sa sensibilité aux bêta-lactamines est très grande. L'antibiotique de choix est la penicilline G, mais le pneumocoque est généralement très sensible à tous les autres antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif. Les aminosides sont inactifs. Une certaine

résistance aux sulfamides et aux tétracyclines prend de plus en plus d'importance. Elle est exceptionnelle aux macrolides et au chloramphénicol.

3. 9. 2. Traitement préventif

La recrudescence actuelle des infections à pneumocoques et la gravité de ces infections malgré l'antibiothérapie, ont justifié la mise au point d'un vaccin anti-pneumococcique. Il est composé de polysaccharides capsulaires des 14 sérotypes les plus fréquemment rencontrés (couvrant plus de 80 % des germes) dans les pays occidentaux.

La vaccination s'adresse tout particulièrement aux sujets de plus de 50 ans, aux bronchitiques, aux insuffisants cardiaques et, en général, aux sujets fragiles. L'immunité conférée à la suite d'une seule injection apparaît après 3 semaines et semble satisfaisante pendant 3 ans au moins.^[3]

3. 9. 3. Vaccins anti-pneumococciques

3. 9. 3. 1. Composition

Pour faire face aux résistances aux antibiotiques et pour empêcher la mortalité qui reste élevée même avec l'aide d'un traitement antibiotique actif, on a mis au point un vaccin anti- pneumococcique polysaccharidique. Il n'était pas possible d'incorporer les 90 sérotypes dans le vaccin. A ce titre les sérotypes ont été choisis d'après leur plus grande fréquence.^[4]

Le vaccin anti- pneumococcique actuel est composé d'un mélange des antigènes polysaccharidiques capsulaires des 23 types sérologiques les plus fréquemment rencontrés.^[16] Ce sont : 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22, 23F, 33F.

On a démontré que les polysaccharides purifiés des pneumocoques induisent la formation d'anticorps. Ces anticorps se fixent sur la capsule, ils attirent les cellules phagocytaires et favorisent ainsi l'ingestion bactérienne, c'est à dire l'opsonisation.

3. 9. 3. 2. Efficacité immunologique du vaccin

Lors d'études récentes réalisées avec les vaccins commerciaux, on a démontré que 90 % des sujets vaccinés avaient une multiplication par 4 du taux de leurs anticorps.

Le vaccin est administré en une seule fois par voie SC (sous -cutanée) ou IM (intra -musculaire). Il serait protecteur cinq ans, mais il n'est pas efficace chez les enfants de moins de 2-3 ans (vaccin thymodependant).^[4]

Le vaccin polysaccharidique capsulaire 23- valents est faiblement immunogène et seulement modestement efficace chez l'enfant. Les vaccins pneumococciques conjugués modernes multivalents sont sécurisés, immunogènes et hautement efficaces dans la protection des enfants contre les maladies invasives causées par les sérotypes contenus dans le vaccin.

Un vaccin contenant 7 serotypes capsulaires (vaccin pneumococcique conjugué 7 ou PCV 7 ; Wyeth- Lederle Vaccines, Pearl River, NY) a une licence aux Etats Unis (Pevnar) et en Europe (Pevnar) et est inclus dans le programme de vaccination des enfants.

Pour que de nouveaux vaccins pneumococciques conjugués puissent fournir un niveau élevé en efficacité dans diverses populations, la distribution des serotypes devrait être connue et les vaccins devraient être

préparés de façon à contenir les serotypes communs qui ciblent la maladie dans la région.^[11]

Le vaccin est conseillé pour les sujets de plus de 65 ans, pour les immunodéprimés ^[4] et tous les 5 ans pour les splénectomisés et les drépanocytaires.^[8] L'efficacité du vaccin jugée sur la prévention des pneumopathies bactériémiques est de l'ordre de 60 %.

Ces «nouveaux vaccins» pourraient protéger le très jeune enfant et l'adulte contre les pneumopathies, les bactériémies voire même les otites. Ces vaccins conjugués limitent le portage pharyngé des types entrant dans leur composition.

3. 10. Sensibilité des pneumocoques aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité des pneumocoques n'est pas toujours simple. L'idéal serait de déterminer la CMI (concentration minimale inhibitrice) de chaque antibiotique pour chaque souche de pneumocoque, ce qui est pratiquement impossible en routine. L'antibiogramme délicat doit être réalisé, en respectant quelques règles précises.

10. 1. Technique de l'antibiogramme pour le pneumocoque

Une colonie isolée est d'abord cultivée en bouillon enrichi en sérum ascite pendant 18 heures.

- dans un volume de 10 ml d'eau distillée, 4 à 8 gouttes de ce bouillon est ajoutées ;
- un ensemencement par inondation d'un milieu de Mueller- Hinton additionné de 5 % de sang de cheval ou de mouton est fait ;

- les disques d'antibiotique sont déposés sur l'ensemencement et la boîte est incubée pendant 18 heures sous CO₂;
- la sensibilité est donnée selon les diamètres de la zone d'inhibition.

3. 10. 2. Lecture de l'antibiogramme

L'apparition en 1967 de souches présentant une sensibilité anormale à la pénicilline et l'augmentation progressive des CMI posent de graves problèmes thérapeutiques. La résistance à la pénicilline G est croisée avec les autres bêta- lactamines mais à des niveaux variables et elle est souvent associée à une résistance vis- à- vis d'autres familles d'antibiotiques (en particulier les sulfamides, macrolides, tétracyclines et chloramphénicol). Chez les pneumocoques, l'acquisition d'une résistance aux bêta- lactamines ne résulte pas de synthèse de bêta- lactamases mais d'une modification des PLP (protéines liant les pénicillines). Au moins quatre des PLP de hauts poids moléculaires peuvent être modifiées et ces nouvelles PLP peuvent présenter jusqu'à 20 % de divergence par rapport aux PLP des souches sensibles. La constitution de ces PLP " mosaïques " est certainement secondaire à des événements multiples de recombinaison avec des gènes provenant d'autres streptocoques. Le caractère naturellement transformable des pneumocoques aurait favorisé ces événements.

La sensibilité à la pénicilline G doit s'apprécier en utilisant un disque d'Oxacilline chargé à 5 µg. Un diamètre de zone d'inhibition ≥ 26 mm indique une souche sensible à la pénicilline G et cette interprétation est prédictive de la sensibilité aux autres bêta- lactamines. Un diamètre ≤ 26 mm révèle une sensibilité intermédiaire ou une résistance.

Les souches de sensibilité anormale aux bêta- lactamines sont classées en souches de moindre sensibilité (CMI comprise entre 0,1 et 1 mg/l) et en souches résistantes (CMI supérieure à 1 mg/l).^[4]

Les principaux problèmes concernant la penicilline G sont que le pneumocoque se situe souvent, pour cet antibiotique, dans les zones de sensibilité intermédiaire, alors qu'en dilution, la souche est sensible. Il est possible de contourner cette difficulté. En effet, il faut savoir que les CMI de l'Oxacilline vis- à- vis du pneumocoque sont 30 fois plus élevées que la CMI de la penicilline G. Autrement dit, si le diamètre de la penicilline G est faible ou en zone intermédiaire, il est préférable de mesurer le diamètre autour de l'Oxacilline (charge 5 µg) avant de répondre pour la penicilline G. Ceci doit être systématiquement exécuté et l'on doit répondre lorsqu'une souche est résistante à l'Oxacilline, que toutes les bêta- lactamines sont résistantes.

L'utilisation d'E- test permet d'obtenir des valeurs de CMI plus fiables que le diamètre d'antibiogramme. En cas de doute, on peut recourir à la détermination directe de la CMI.

Les céphalosporines ne sont pas plus actives que la penicilline G ; les céphalosporines de la troisième génération (cefotaxime, ceftriaxone) ont toutefois des CMI assez basses (0,001- 0,06 mg/l). Comme pour tous les streptocoques les aminosides sont inefficaces.^[1]

3. 10. 3. Technique d'E-test

La détermination rapide de la CMI d'un antibiotique est parfois nécessaire pour vérifier ou compléter les données de l'antibiogramme (pneumocoques de sensibilité diminuée aux bêta -lactamines). Elle est désormais possible grâce à l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un

gradient de concentration de l'antibiotique, appelées E- test. Cette bandelette est déposée sur une gélose ensemencée en inondation ou par écouvillonnage. Elle détermine dans la gélose un gradient de concentrations de l'antibiotique tel que la zone d'inhibition délimite une ellipse plus ou moins longue selon la CMI de l'antibiotique. La lecture de la CMI se fait directement sur la bandelette au point d'intersection avec la zone d'inhibition. La simplicité de cette technique ne doit pas faire oublier les conditions rigoureuses de réalisation indiquées par le fournisseur, en particulier l'inoculum et le temps de séchage avant de déposer la bandelette doivent être respectés. Cette technique semble bien corrélée avec la technique de référence pour de nombreux couples antibiotique/bactérie. Son seul inconvénient est son prix élevé.



Figure 7 : E- test (*STREPTOCOCCUS pneumoniae* sur gélose au sang) ^[22]

Le diamètre de la zone d'inhibition augmente avec la CMI.

3. 11. Epidémiologie

Cosmopolite, le pneumocoque l'est au sens strict puisque responsable de nombreux décès dans chaque pays, avec une attention toute particulière en Afrique et aux Etats- Unis ; dans ce dernier pays, il demeure la première cause de décès par maladie infectieuse. A l'échelon de l'individu, il atteint électivement les voies respiratoires inférieures et supérieures, avec une éventuelle diffusion ORL ou méningée et possible dissémination sanguine.^[23]

Les pneumocoques sont des germes commensaux des voies respiratoires supérieurs de l'homme et de nombreux mammifères. La fragilité très grande de ces germes explique d'une part qu'ils ne survivent pas dans le milieu extérieur où on ne les retrouve jamais, et d'autre part que les bactéries soient transmises d'homme à homme par voie aérienne.

La majorité des infections surviennent dans l'enfance avant l'apparition de l'immunité naturelle résultant du portage. Cependant, la diversité des sérotypes capsulaires explique la possibilité de multiples infections chez un même individu (immunité de sérotype).^[7]

La fréquence des infections à pneumocoques est variable selon la saison, le sexe, l'âge, le terrain et, des 84 types de pneumocoques, certains ont une incidence particulière.^[23]

Certains sérotypes capsulaires sont plus virulents que d'autres mais leur incidence varie selon les pays. Parmi eux, le sérotype 3 est probablement responsable des infections les plus sévères.^[2]

3. 11. 1. Selon la saison

La transmission respiratoire du germe ainsi que son habitat oropharyngé expliquent l'incidence maximale à la saison froide en hiver et au printemps.^[2]

Les infections à pneumocoques prédominent pendant les mois de novembre à mai.

3. 11. 2. Selon le sexe

La prédominance masculine des infections à pneumocoques est retrouvée dans toutes les études, françaises ou étrangères, avec 2 hommes pour 1 femme en général, quel que soit l'âge, 5 hommes pour 1 femme même dans certaines séries.^[23]

Dans tous les pays le sexe masculin est plus touché par ces infections.^[20]

3. 11. 3. Selon l'âge

La répartition par âges de l'atteinte pneumococcique met en évidence une prépondérance sur les 2 extrémités de la vie : le pneumocoque est un germe de l'enfant jeune, de moins de 2 ans.

Les infections à pneumocoques sont également fréquentes chez le sujet âgé : 45 % des malades d'Austrian ont plus de 50 ans, 28 % de ceux de Plyer ont plus de 60 ans, 40% de ceux de Fourrier plus de 70 ans. Les localisations sont alors essentiellement pulmonaires, avec ou sans bactériémie, et l'âge élevé devient un élément essentiel du terrain.

3. 11. 4. Selon le terrain

Ne fait pas, en règle général, une affection à pneumocoques qui veut. Le pneumocoque agit souvent comme un germe opportuniste, l'infection venant compliquer une pathologie sous-jacente.^[23]

La notion de terrain joue un rôle certain : fréquence chez le jeune enfant et les personnes âgées, chez les bronchitiques chroniques, les splénectomisés, les cirrhotiques, les cancéreux qui s'infectent avec leurs propres pneumocoques.^[3]

Il est important de souligner toutefois que la maladie est peu épidémique et que l'infection est le plus souvent au point de départ «endogène», ce qui explique que les mesures de protection applicables à la méningite à méningocoque sont sans intérêt dans la méningite à pneumocoque.^[2]

2. METHODOLOGIE

2. 1. Présentation de la méthode

L'appareil "Bactec 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md." et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bioMérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Les microorganismes 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 microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré- programmés ^[7].

Le système "BacT- ALERT 3D Combination" fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacons 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 ^[9].

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

Un volume de 5 ml de sang est prélevé sur le patient et injecté directement dans les flacons d'hémoculture qui sont saisis dès que possible dans l'appareil pour garantir son efficacité. Il s'agit d'une innovation par rapport à l'hémoculture classique qui demande un volume de 10 ml de sang.

Le Bactec 9050 fonctionne par un système d'agitation continue des flacons versus intermittent des Bactec des séries de grande capacité (Bactec 9120 et Bactec 9240) ^[24] .

Il existe 5 types de flacons Bactec :

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

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

2. 2. Le Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée dans le laboratoire de l'Hôpital Gabriel TOURE situé en plein centre de Bamako. C'est l'ancien Dispensaire Central de Bamako, devenu le deuxième hôpital national du pays et qui porte le nom Gabriel TOURE mort à la tâche. Le laboratoire actuel est l'ancienne pharmacie de l'hôpital réaménagée en laboratoire. Il comprend une salle d'hématologie, une salle de biochimie, une salle de prélèvements et la parasitologie, une salle de stérilisation équipée d'autoclaves et de fours, une salle de garde et un bureau du chef de service. En février 2002 une partie du

laboratoire a été aménagée pour les activités de bactériologie et équipée en conséquence avec :

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des Öeses;
- 2 automates d'hémocultures Bactec 9050 ;
- 1 incubateur à CO₂ pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO₂ pour les bactéries aérobies, les antibiogrammes et les galeries d'identification API 20E ;
- 1 centrifugeuse ;
- 1 congélateur à - 80 °C pour la conservation des souches bactériennes
- 1 congélateur à - 20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques, des disques d'identification (Optochine, Bacitracine) des facteurs de croissance des *HAEMOPHILUS* ;
- 2 réfrigérateurs pour la conservation des milieux de culture et des réactifs ;
- 1 micro- ordinateur avec un système de communication Internet ;
- 1 microscope Olympus CX31 ;
- 1 néphélomètre Mc Farland pour les mesures de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de KIRBY BAUER ;

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

Le personnel comprend :

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

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

Les activités de bactériologie dans le cadre de la recherche sont supervisées par un Professeur de bactériologie- virologie responsable de l'INRSP.

2. 3. L'étude

2. 3. 1. Type d'étude

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

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

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

2. 3. 2. Durée de l'étude

L'étude a été réalisée sur une période d'un an : de Novembre 2003 à Octobre 2004, couvrant les trois saisons : saison sèche fraîche, saison sèche chaude, saison pluvieuse.

2. 3. 3. Critères d'inclusion et de non - inclusion

2. 3. 3. 1. Critères d'inclusion

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

- être âgé de moins de 17 ans,
- être hospitalisé dans le service de pédiatrie de l'HGT,
- avoir une température corporelle ≥ 39 °C à l'admission;
- avoir une "Suspicion d'Infection Bactérienne Invasive" (SIBI) ;
- le consentement éclairé des parents est sollicité pour les enfants âgés de moins de 13 ans ;
- l'assentiment des enfants de 13 à 16 ans est obligatoire.

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

Ne prennent pas part à l'étude :

- les nouveau- nés malades n'ayant jamais quitté l'HGT depuis sa naissance ;

- les enfants âgés de 13 à 16 ans incapables ou refusant de donner tout consentement, pas à cause de la gravité de sa maladie ;
- l'incapacité ou refus du parent ou de l'accompagnant du patient à donner un assentiment.

2. 4. Protocole et méthode de travail des cultures du LCR et des autres liquides

biologiques

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

2. 4. 1. Traitement des prélèvements de LCR

Les prélèvements sont reçus au laboratoire dans des tubes stériles et sont immédiatement identifiés puis enregistrés dans le registre de laboratoire.

Le reste du travail se fera sous une hotte à flux laminaire.

Les tests sur le LCR sont réalisés dans l'ordre suivant :

1. nous identifions les boîtes de gélose ainsi que la lame pour le frottis ;
2. nous déposons sur les géloses au sang de cheval et chocolat 2 à 3 gouttes de LCR. Les boîtes de gélose sont ensuite fermées. La gélose est laissée imbiber durant quelques minutes ;
3. une goutte de LCR est déposée sur une lame propre en vue de confectionner un frottis ;

4. après avoir laissé sécher la lame de frottis, elle sera fixée par chauffage pendant 5 secondes à partir de l'incinérateur de la hotte ;
5. l'hémocytomètre est rempli de LCR afin d'effectuer un comptage cellulaire ;
6. les 2 à 3 gouttes de LCR préalablement déposées sur les géloses sont ensemencées . Les boîtes sont ensuite mises dans l'incubateur à CO₂ en les renversant ;
7. les tests d'agglutination sont faits avec le sérum latex Pastorex Meningitis kit ;
8. nous procedons à la coloration de Gram ;
9. le reste du LCR est gardé dans le réfrigérateur pendant 5 jours.

2. 4. 2. Traitement des autres liquides biologiques

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

Les résultats suivants doivent être notifiés au médecin du patient dans les deux heures qui suivent la réception du prélèvement au laboratoire, il s'agit :

- du résultat de la coloration de Gram ;
- du résultat du comptage cellulaire ;
- du résultat des tests d'agglutination.

Une «fiche de travail LCR» est fait pour chaque patient. Le nom du patient, le numéro du dossier et la date du prélèvement sont enregistrés dans le registre de travail.

2. 4. 3. Protocole de travail de la Culture du LCR et des autres liquides biologiques

Les boîtes de gélose au sang et au chocolat sont examinées tous les jours pendant 5 jours et les résultats sont enregistrés sur la fiche de travail.

Si une colonie bactérienne est observée sur les géloses, une coloration de Gram est effectuée. Les résultats de la coloration de Gram ainsi que la description des colonies sont portés sur la fiche de travail.

Le service de pédiatrie est informé de la positivité de la culture du LCR.

Les procédures d'identification sont suivies pour les cultures positives.

2. 5. Protocole de Technique des hémocultures positives

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

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

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

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

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

3. nous procédons à la lecture de la coloration de Gram :

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

- si des micro-organismes sont détectés, la bouteille n'est plus rémise dans le Bactec 9050. Les résultats de la coloration de Gram sont portés sur la «fiche de travail hémoculture». Par exemple : CGPgr, CGPpr, CGPch, BGP, BGN, *Cocco*BGN, DCGN, Levures... ;

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

5. si des *cocci* Gram positif en paires ou en chaînettes sont observés, un disque de Bacitracine (A) ainsi qu'un disque d'Optochine (P) sont déposés sur la gélose au sang de la subculture ;

6. les boîtes contenant les subcultures sont mises dans l'incubateur à CO₂. Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les boîtes ;

7. lorsqu'une croissance est observée, les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées, sont portées sur la fiche de travail

ainsi que les résultats de la coloration de Gram effectués et l'aspect de chaque colonie bactérienne ;

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

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

- si le micro-organisme est Catalase positif et ressemble au *STAPHYLOCOCCUS* (*cocci* Gram positif en grappes), un test de Coagulase est fait. Si le micro-organisme est coagulase positive, il faudrait l'enregistrer comme étant *STAPHYLOCOCCUS aureus*. Si le micro-organisme est coagulase négatif après 24 heures, il faudrait l'enregistrer comme étant *STAPHYLOCOCCUS* à coagulase Négative ;

- si le micro-organisme est catalase négatif, bêta-hémolytique, et Bacitracine positif (inhibé par la Bacitracine), le micro-organisme est enregistré comme étant *STREPTOCOCCUS Groupe A* ;

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

- si le microorganisme est catalase négatif, bêta-hémolytique, et Bacitracine négatif, on fait des tests d'agglutination des streptocoques des groupes A et B. Le micro-organisme est enregistré comme étant Streptocoque bêta-hémolytique de groupe A, de groupe B ou non groupable ;

- si le microorganisme est catalase négative, Optochine positif (inhibé par le disque d'Optochine) et diplocoque Gram positif, le micro-organisme est

enregistré comme étant *STREPTOCOCCUS pneumoniae*. Si le test d'Optochine est négatif ou non concluant, on fait un test de «bile solubility». Si le test de solubilité par la bile est positif, le micro-organisme est enregistré comme étant *STREPTOCOCCUS pneumoniae*.

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

Si le résultat du PYR test est positif, le micro-organisme est enregistré comme étant *ENTEROCOCCUS species*. Si le résultat du PYR test est négatif, le micro-organisme est enregistré comme étant *STREPTOCOCCUS* Alpha ou Gamma Hémolytique selon la réaction d'hémolyse ;

9. si le micro-organisme est un bacille Gram positif, aucun test additionnel n'est effectué. Le micro-organisme est enregistré comme «Bacille Gram Positif » ;

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

- si le micro-organisme pousse sur la gélose au sang et la gélose Mac Conkey, un test d'oxydase et une galerie API 20^E sont fait. Les *ENTEROBACTERIACEAE* (tels que *ESCHERICHIA*, *SALMONELLA*, *SHIGELLA*) sont oxydase-négatifs ; les *VIBRIO* et *PSEUDOMONAS* sont oxydase positifs. Si les micro-organismes isolés sont identifiés comme étant *SALMONELLA*, *SHIGELLA* ou *VIBRIO*, le résultat est confirmé par un test de sérotypage ;

- si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose au chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et est diplocoque Gram négatif, *NEISSERIA meningitidis* pourrait être suspecté. Il faudra faire un test d'oxydase. Si l'identification préliminaire indique *NEISSERIA meningitidis*, la confirmation est faite par un test de sérotypage ;

- si le micro-organisme ne pousse que sur la gélose au sang de cheval ou de mouton et sur la gélose chocolat mais pas sur la gélose Mac Conkey et se présente comme de petits bacilles Gram-négatif, *HAEMOPHILUS influenzae* est suspecté. Un test d'oxydase et des facteurs X et V sont faits. Si l'identification indique *HAEMOPHILUS influenzae*, la confirmation est faite par un test de sérotypage ;

11. un antibiogramme est fait par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon KIRBY-BAUER ;

12. le résultat est enregistré dans le registre de laboratoire et le médecin du patient est informé de l'identification finale.

2. 6. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

2. 6. 1. Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram est la coloration la plus importante dans le laboratoire de microbiologie. Les bactéries peuvent être divisées en micro-organismes Gram positif et en micro-organismes Gram négatif.

Les bactéries Gram positif retiennent la coloration violette du Violet de Gentiane (ou du Cristal Violet) et auront une teinte bleue au microscope.

Les bactéries Gram négatif peuvent être décolorées, leur enlevant ainsi la coloration violette du Violet de Gentiane avec une solution d'alcool acétone. Les bactéries sont ensuite colorées en rouge avec la safranine (ou la fuchsine basique).

C'est parce que la coloration de Gram est très importante, qu'elle doit être accomplie avec le plus grand soin.

Matériels et réactifs utilisés

- microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100 ;
- huile à immersion ;
- coffret de colorants de Gram contenant :
 - violet de gentiane ou cristal violet ;
 - solution de lugol ;
 - solution de décolorant alcool acétone ;
 - safranine ou fuchsine basique ;
- lames porte-objet ;
- portoir de lame ;
- crayon de papier ;
- papier buvard ;
- flacon d'eau distillée ;
- bac de coloration.

Procédure de la coloration

1. une lame propre est utilisée. La lame est identifiée à l'aide d'un crayon de papier (le numéro de dossier du patient, la date et l'initial du technicien). On n'utilise pas de stylo à bille ;
2. un frottis mince est confectionné sur la lame de verre. Il est séché à l'air libre (la lame ne doit pas être chauffée pour faire sécher rapidement le frottis) ;
3. lorsque la lame est complètement séchée, la tenir contre l'incinérateur jusqu'à ce qu'elle soit tiède sans être brûlante au toucher ;
4. le Violet de Gentiane est mis sur le frottis de la lame pendant 30 à 40 secondes ;
5. le surplus de la solution de Violet de Gentiane est versé et la lame est rincée avec un jet d'eau faible. L'excès d'eau est égoutté à l'aide d'un papier buvard. Il faut utiliser un faible jet d'eau pour laver la lame, si non le spécimen se détache de la lame ;
6. la solution Iode- iodure (Solution de Lugol) est mise pendant 30 à 40 secondes;
7. la solution de Lugol est versée et la lame est la rincée avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;
8. goutte à goutte la solution de décolorant alcool- acétone est versé sur la lame de manière à recouvrir entièrement le frottis ;
9. immédiatement après, la lame est rincée avec un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau ;

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

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

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

Interprétation

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

Par exemple

Cocci Gram positif en grappes = *STAPHYLOCOCCUS*

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

Cocci Gram positif en chaînettes = *STREPTOCOCCUS*.

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

Cocci Gram positif en paires = *STREPTOCOCCUS pneumoniae* ou *ENTEROCOCCUS*

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

Bacilles Gram positif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles à Gram positif comprenant *CORYNEBACTERIUM*, *LACTOBACILLUS*, *PROPIONIBACTERIUM*.

Cocci Gram négatif en paires = *NEISSERIA*

Note : Les *cocci* Gram-négatif les plus connus sont arrangés en paires (diplocoques) et attachés par leur côté. Ils ressemblent à des grains de café.

Bacilles Gram négatif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles Gram négatif comprenant *HAEMOPHILUS*, *ESCHERICHIA*, *SALMONELLA*, *SHIGELLA*, *PSEUDOMONAS*, *VIBRIO*.

2. 6. 2. Tests biochimiques et métaboliques

2. 6. 2. 1. Observation de la réaction d'Hémolyse

L'habileté des bactéries à lyser les cellules du sang contenues dans la gélose au sang frais est une caractéristique importante et utile pour leur identification. Quelques bactéries ont besoin de plus d'un jour avant que ne soit observée une lyse des cellules du sang. Il faut une attention particulière pour observer la lyse des cellules. Typiquement, trois formes de lyse sont observées :

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

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

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

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

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

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

2. 6. 2. 2. Catalase

Principe

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

Matériels et réactifs utilisés :

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

Procédure

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

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

Interprétation

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

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

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

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

2. 6. 2. 3. 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'Optochine 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 des 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

- le micro-organisme est ensemencé sur une gélose au sang.
- dans l'espace où la croissance est la plus dense (c'est à dire la première partie de la boîte qui est inoculée), un disque d'Optochine est placé .
- la boîte est mise dans l'incubateur à CO₂.

Le lendemain de l'incubation, la gélose au sang est examinée pour voir l'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque d'Optochine. La sensibilité est donnée par le diamètre de la zone d'inhibition.

Interprétation

Réaction positive = inhibition de la 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 le test de «bile solubility» sont tous les deux négatifs, le micro- organisme 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*.

5. 3. Tests immunologiques : Tests d'agglutination Slidex méningite Kit

Principe

Les réactifs Slidex méningite, constitués de particules de latex sensibilisées par des antisérums spécifiques, permettent, par une technique d'agglutination rapide sur carte, de détecter l'antigène correspondant dans le LCR.

Matériels

Le coffret contient :

Réactif R1 : Latex *HAEMOPHILUS influenzae* type b ;

Réactif R2 : Latex *STREPTOCOCCUS pneumoniae* ;

Réactif R3 : Latex *NEISSERIA meningitidis* groupe A ;

Réactif R4 : Latex *NEISSERIA meningitidis* groupe B / *ESCHERICHIA coli* K1;

Réactif R5 : Latex *NEISSERIA meningitidis* groupe C ;

Réactif R6 : Contrôle Positif, extrait antigénique de : *HAEMOPHILUS influenzae* type b, *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, *NEISSERIA meningitidis* groupe A, *NEISSERIA meningitidis* groupe B, *NEISSERIA meningitidis* groupe C ;

Cartes jetables ;

Bâtonnets jetables.

Méthodologie

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

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

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

4- A chacune des gouttes, ajouter une goutte de LCR ;

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

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

Lecture

Réaction négative : suspension homogène.

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

Interprétation des résultats

- Une réaction positive avec l'un des réactifs latex témoigne de la présence dans le liquide biologique de l'antigène correspondant ;
- Une réaction positive avec le latex R4 (*NEISSERIA meningitidis* groupe B/*ESCHERICHIA coli* K1), chez un nouveau-né ou un prématuré, traduit dans la majorité des cas la présence d'*ESCHERICHIA coli* K1 ; chez un sujet plus âgé, elle traduit plus probablement la présence de *NEISSERIA meningitidis* B ;
- En cas d'apparition d'une agglutination en moins de 2 minutes avec deux réactifs latex ou plus, la réaction est ininterprétable.

2. 6. 4. Test de Sensibilité aux antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon KIRBY-BAUER

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

Principe

La méthode de diffusion des disques selon KIRBY-BAUER est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance

bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion du disque d'antibiotique et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du micro-organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

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

Matériels et réactifs utilisés :

- gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval (MHA-B) ;
- solution saline stérile à 0,85 % ;
- standard 0,5 de Mc Farland ;
- disques d'antibiotiques pour test de sensibilité ;
- écouvillons en coton stérile ;
- pipettes à sérum ;
- pinces à disques et/ ou applicateurs de disque.

Conditions de stockage nécessaires

1. milieux de culture MHA-B : A conserver au réfrigérateur, ils doivent être réchauffés à la température de la salle avant leur utilisation. Les boîtes non-stockées dans des sacs en plastique se déshydrateront et ne pourront pas être utilisées convenablement ;
2. solution saline stérile : A conserver au réfrigérateur ;
3. standard 0.5 de Mc Farland : A conserver au noir dans un récipient. Ne pas utiliser de tube rayé. Le diamètre du tube doit être le même que celui des tubes de solution saline utilisés pour la préparation des tests d'inoculum ;
4. disques d'antibiotiques : Congeler les disques à moins 20°C ou à une température plus basse pour de longue conservation ;
5. dès qu'une boîte est ouverte pour usage, elle peut être conservée au réfrigérateur dans une capsule bleue de 50 ml ensemble avec le dessiccateur.

Procédure du test

1. les boîtes de gélose doivent être réchauffées à la température de la salle avant qu'elles ne soient inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais des gouttelettes d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le micro-organisme ;
2. La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour *STREPTOCOCCUS pneumoniae* et pour les autres tests ;
3. les disques pour le test de sensibilité sont enlevés du réfrigérateur afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle, auparavant 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. Les dates d'expiration sont vérifiées sur les récipients des antibiotiques ; les disques périmés ne sont pas utilisés.

4. Au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang sont sélectionnées. Ne pas sélectionner des colonies de la boîte de gélose MacConkey. Le sommet de chaque colonie est touché avec une anse et transféré dans un tube de solution saline. L'inoculum de la solution saline est ajusté à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de MacFarland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté ;

5. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension ajustée. L'écouvillon est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. La surface entière de la boîte de gélose est inoculée en faisant tourner la boîte d'approximativement 60 °C et l'ensemencement est fait de nouveau. La boîte est tournée 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. Une boîte de gélose est inoculée pour *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, *STAPHYLOCOCCUS aureus*, *HAEMOPHILUS influenzae* et deux pour les autres bacilles Gram négatifs ;

7. L'excès d'humidité doit être absorbé par la gélose pendant 5 à 10 minutes avant d'appliquer les disques d'antibiotiques. Les disques d'antibiotique sont

placés 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 presque immédiatement dans la gélose.

Les applicateurs de disques d'antibiotiques sont souvent utilisés ;

8. les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

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

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

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

d. pour les autres bacilles Gram négatif ;

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

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

9. on laisse 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 ou après 24 heures, les résultats pourraient ne pas être précis.

2. Les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque sont mesurés , 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, exceptée la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.

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

b. avec le Cotrimoxazole, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. On ne tiendra

pas compte de la faible croissance, on doit lire seulement les limites de la croissance en abondance ;

c. on se réfère à la « carte de référence » pour l'interprétation des tests

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

Compte-rendu

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

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

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

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

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

2. 6. 5. Sérotypage des souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*

Le sérotypage de certaines souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées par notre laboratoire a été fait au " Laboratorio *PNEUMOCOCCUS* Instituto de Salud Plublica à Santiago au Chili " collaborateur des Laboratoires CVD.

Ces souches ainsi sérotypées ne sont pas incluses dans notre période d'étude.

2. 7. Conservation des cultures pures ^[18]

Les laboratoires de bactériologie ont le désir et le souci de conserver les cultures des différentes espèces bactériennes isolées. Ces cultures servent de souches de référence. Elles sont fréquemment utilisées pour l'enseignement, le contrôle, ou la recherche. L'intérêt de se référer à des souches standard est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis.

En Angleterre, la plus connue est la «National Collection of Type Cultures» (NCTC). En France, la plus importante est celle de l'Institut Pasteur de Paris. Lorsqu'une nouvelle espèce est isolée, il est recommandé de l'envoyer dans plusieurs de ces collections internationales pour la faire connaître.

Deux possibilités sont offertes aux collectionneurs pour maintenir les souches en survie et leur conserver toutes leurs propriétés. On peut simplement les cultiver sur des milieux adaptés et les transférer périodiquement sur des milieux neufs. Il est nécessaire de bien connaître le milieu le plus convenable, la température la plus favorable et la durée limite de stockage. Les précautions élémentaires suivantes sont prises pour assurer cette conservation :

- la dessiccation du milieu est évitée en bouchant soigneusement l'orifice des tubes de culture ou mieux en les scellant au chalumeau ;
- la culture est conservée à l'abri de la lumière ou à la température du laboratoire ou dans les meilleures conditions, au réfrigérateur (+4°C) ;
- le milieu de culture est dans le cas le plus général une gélose nutritive inclinée,ensemencée en plusieurs points ou une gélose nutritive en culot,ensemencée par piqûre centrale.

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

Les souches isolées dans notre d'étude sont conservées par congélation. Deux paramètres importants parmi d'autres conditionnent sa mise en œuvre : le choix de la température et surtout la vitesse d'abaissement à la température choisie.

Pour conserver dans les meilleures conditions les structures cellulaires, il convient de les congeler à la température la plus basse et d'y parvenir dans les délais les plus brefs. Nos souches sont conservées dans un congélateur de moins 65°C à moins 90°C.

Chaque souche porte une étiquette d'identification.

E B T / D
N° B-P
N° D et N G I
I M /E ₂

E : Etage du congélateur

B : Bloc

T : Tiroir

D : Date

N° B-P : numéro de la boîte et position de la souche

N° D et N G I : numéro de dossier du patient et germe isolé

I M /E₂ : initiale du patient /Etude2

7. Eléments de l'assurance qualité

Les procédures suivantes sont suivies :

- l'identification des spécimens ;
- l'enregistrement dans les registres de travail ;

- la saisie des résultats ;
- le contrôle de qualité consistant en :

2. 8. 1. Le suivi des appareils

2. 8. 1. 1. Relevé des températures quotidiennes

On procède à un relevé quotidien de température :

- du congélateur de conservation des souches, intervalle de température moins 65 à moins 90 °C ;
- du congélateur de conservation des antibiogrammes, intervalle de température moins 20 à moins 30 °C ;
- des réfrigérateurs de conservation des réactifs et milieux de cultures, intervalle de température 2,8 à 8 °C ;
- des automates Bactec.

2. 8. 1. 2. Suivi du niveau d'eau de l'incubateur

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

2. 8. 1. 3. Nettoyage des filtres

Les filtres situés sur les côtés latéraux des Bactec sont nettoyés tous les 15 jours.

2. 8. 1. 4. Contrôle de la turbidité de l'appareil Mc Farland

2. 8. 2. Le contrôle de la qualité des réactifs et milieux de cultures :

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

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

Il s'agit :

1. Des milieux de culture : gélose au sang de mouton ou de cheval, gélose Mac Conkey, Mueller Hinton, gélose chocolat, gélose trypticase soja.

2. Des réactifs qui permettent la réalisation des techniques suivantes :

Coloration de Gram, catalase, coagulase, oxydase, réactifs de révélation de la galerie API 20 E,

3. Des disques de facteurs X, V et X+V, disque d'Optochine, disque de Bacitracine.

3. RESULTATS

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

Les résultats sont présentés ainsi qu'il suit :

- Fréquence des prélèvements
- Germes identifiés à partir des prélèvements
- Profil antibiotique des souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*
- Résultat du typage des souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*
- Répartition saisonnière des cas de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*
- Résultats du contrôle de qualité des cultures

3. 1. Fréquence des prélèvements

Tableau I : Fréquence des prélèvements étudiés de Novembre 2003 à
Octobre 2004

Types de prélèvements	Effectifs	Pourcentage %
Hémoculture	1633	60,17
LCR	1027	37,84
Autres liquides	54	1,99
TOTAL	2714	100,00

Au cours de la période de Novembre 2003 à Octobre 2004 il a été effectué 2714 examens pour 1633 inclusions bénéficiant systématiquement d'une hémoculture.

Tableau II : Fréquence des prélèvements selon les mois de la période d'étude

Mois Prélèvements	Nov 03	Déc 03	Jan 04	Fév 04	Mar 04	Avr 04	Mai 04	Jui 04	Juil 04	Aou 04
Hémoculture	77	102	66	105	174	196	174	116	118	141
LCR	42	74	50	71	116	28	97	70	79	82
Liquide pleural	0	3	2	4	3	5	2	2	5	2
Autres liquides*	0	1	0	0	0	3	6	0	0	2
TOTAL	119	180	119	180	296	332	279	188	202	227

* = Aucun prélèvement de ces autres liquides n'a donné *STREPTOCOCCUS pneumoniae*

Les prélèvements de l'hémoculture et du LCR sont uniformément répartis selon les mois de la période d'étude.

2. Germes identifiés à partir des prélèvements

Tableau III : Résultats des examens préliminaires sur le LCR de
 Novembre 2003 à Octobre 2004

Comptage cellulaire	Test d'agglutination	Résultats de la coloration de GRAM				
		GRAM (+)			GRAM (-)	
		Culture(+)	Culture(-)	Total	Culture(+)	Culture(-)
G B ≥150	Agglutination (+)	90	19	109	9	1
	Agglutination (-)	12	3	15	26	5
	Agglutination non faite	24	2	26	11	1
	Total 1	126	24	150	46	7
G B <150	Agglutination (+)	23	4	27	0	0
	Agglutination (-)	1	0	1	0	0
	Agglutination non faite	1	1	2	97	62
	Total 2	25	5	30	97	62
TOTAL(Total 1+2) GRAM		151	29	180	143	70

Lorsque le Gram sur le prélèvement de LCR direct est positif, il existe une bonne corrélation entre le test d'agglutination positif et culture positive soit 71,42 % contre 9,52 % de test d'agglutination négatif et culture positive. Ce contexte correspond à une cellularité supérieure à 150 (GB supérieur à 150 trouble ou purulent) soit 84 % des Gram positifs.

Lorsque les GB sont inférieurs à 150 le Gram est négatif dans 96,02 % des cas.

Bien que le Gram soit négatif avec une cellularité inférieure à 150 ; 13,39 % des cultures sont positives.

Tableau IV : Résultats de la culture

Types de prélèvements et cultures		Résultats culture	Nombre	Pourcentage
Hémocultures	Bactec positif	Germes pathogènes	356	21,80
		Contaminants	145	8,88
		Négatives	34	2,08
	Total	535		
	Bactec négatif	Négatives	1098	67,24
Total 1			1633	100,00
LCR	Cultures positives	Germes pathogènes	200	19,47
		Contaminants	90	8,76
	Cultures négatives	Négative s	737*	71,76
Total 2			1027	100,00
Autres liquides	Cultures positives	Germes pathogènes	30	55,56
		Contaminants	3	5,56
	Cultures négatives	Négatives	21	38,89
Total 3			54	100,00
TOTAL (1+2+3)			2714	

* = LCR mis en bouillon Bactec : résultat Bactec positif avec culture sur milieux solides négatives

Au total 535 hémocultures en Bactec sont sorties positives soit 32,76 % et 1098 négatives soit 67,24 %. Parmi ces hémocultures positives on note 145 contaminants soit un taux de 8,88 % contre une valeur admise de 15 % ; 34 cultures négatives après isolement sur milieux solides soit 2,8 %.

Les patients inclus ont bénéficié de 1027 examens de LCR dont 200 cultures positives avec germes pathogènes soit 19,45 %. Pour 290 LCR positifs en cultures on dénombre 90 contaminants soit 8,76 % contre une valeur admise de 5 %.

Il a été effectué en plus 54 autres prélèvements d'autres liquides biologiques (liquide pleural, liquide articulaire, liquide musculaire, etc..)

Tableau V : Principaux germes isolés des hémocultures

N°	Nature des germes	Nombres	Pourcentage %
1	<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	117	32,87
2	<i>HAEMOPHILUS influenzae</i> b	115	32,3
3	<i>SALMONELLA</i> spp	31	8,71
4	<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	26	7,30
5	<i>ESCHERICHIA coli</i>	15	4,21
6	<i>SALMONELLA Typhi</i>	12	3,37
7	<i>SALMONELLA paratyphi</i> B	8	2,25
8	<i>ENTEROCOCCUS</i> spp	5	1,40
9	<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe A	4	1,12
10	<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe A	3	0,84
11	<i>KLEBSIELLA pneumoniae</i>	3	0,84
12	<i>CITROBACTER frundii</i>	2	0,56
13	<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	2	0,56
14	<i>HAEMOPHILUS parainfluenzae</i>	1	0,28
15	<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe B	1	0,28
16	<i>STREPTOCOCCUS</i> non hémolytique.	1	0,28
17	<i>MORGANELLA morgani</i>	1	0,28
18	<i>SALMONELLA arizonae</i>	1	0,28
19	<i>SALMONELLA paratyphi</i> A	1	0,28
20	<i>CITROBACTER species</i>	1	0,28
21	<i>PSEUDOMONAS putida</i>	1	0,28
22	<i>NEISSERIA meningitidis</i> W135	1	0,28
23	<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe C	1	0,28
24	<i>SALMONELLA paratyphi</i> C	1	0,28
25	<i>ENTEROBACTER cloacae</i>	1	0,28
26	<i>FLAVOBACTERIUM meningosepticum</i>	1	0,28
	TOTAL	356	100,00

Sur 1633 hémocultures effectuées ; nous avons isolé 117 souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, soit une fréquence de 7,16 %.

Au total 356 souches bactériennes pathogènes ont été isolées des hémocultures positives. *STREPTOCOCCUS pneumoniae* représente 32,87 % de ces souches.

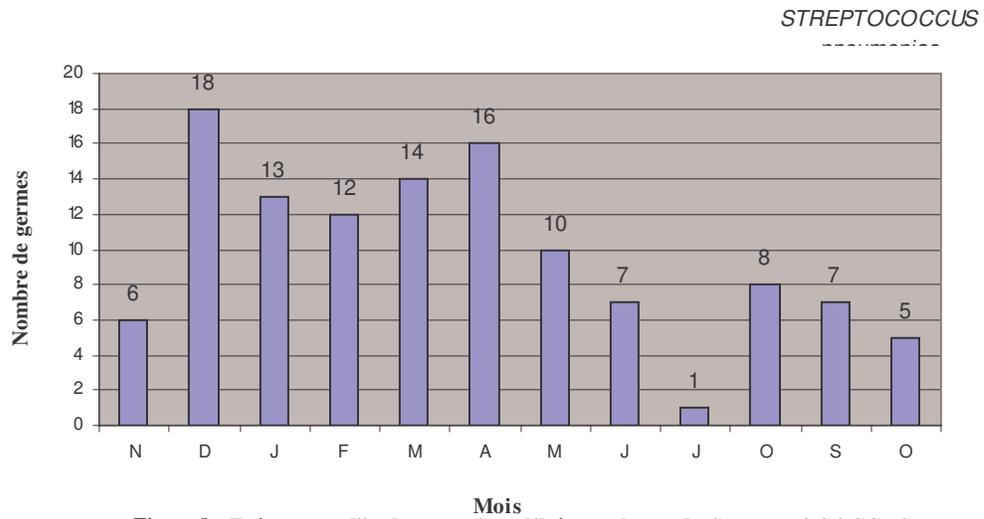


Figure 8 : **Fréquence d'isolement dans l'hémoculture de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* selon les mois de la période d'étude**

Tableau VI : Principaux germes isolés du LCR

N°	Nature des germes	Nombres	Pourcentage %
1	<i>HAEMOPHILUS influenzae</i>	92	46
2	<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	84	42
3	<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe A	8	4
4	<i>ESCHERICHIA coli</i>	3	1,5
5	<i>SALMONELLA spp</i>	2	1
6	<i>SALMONELLA paratyphi</i> B	2	1
7	<i>ACINETOBACTER calcovar</i>	2	1
8	<i>NEISSERIA meningitidis</i> W135	1	0,5
9	<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	1	0,5
10	<i>KLEBSIELLA pneumoniae</i>	1	0,5
11	<i>ENTEROCOCCUS spp</i>	1	0,5
12	<i>CITROBACTER frundii</i>	1	0,5
13	<i>MORGANELLA morganii</i>	1	0,5
14	<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	1	0,5
	TOTAL	200	100

Sur 1027 LCR effectués ; nous avons isolé 84 souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, soit une fréquence de 8,17 %.

Au total 200 souches bactériennes ont été isolées du LCR positives en cultures. *STREPTOCOCCUS pneumoniae* représente 42 % de ces souches.

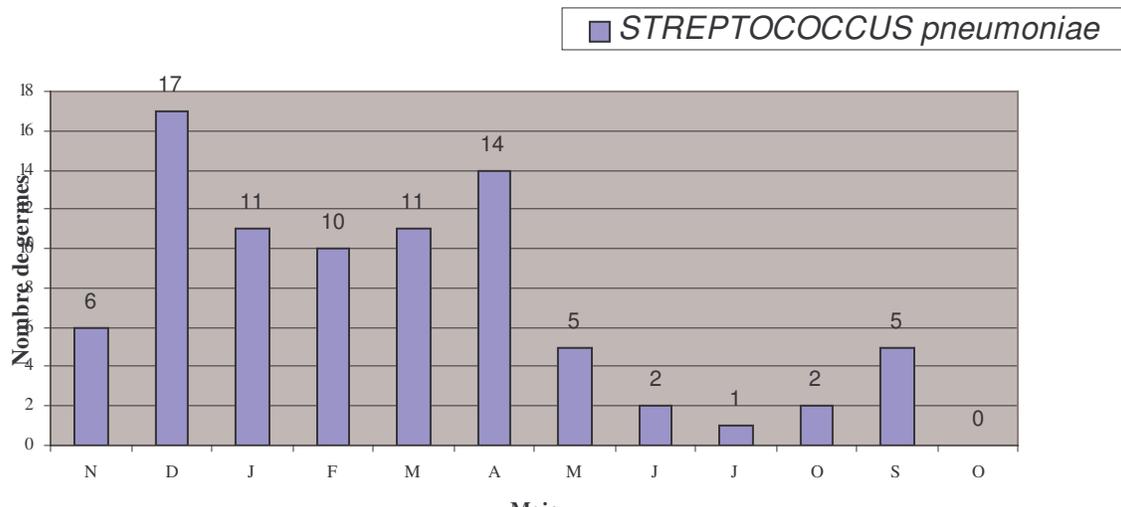


Figure 9 : Fréquence d'isolement dans le LCR de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* selon les mois de la période d'étude

Tableau VII : Principaux germes isolés des autres liquides biologiques

Germes	Nombre/Type de prélèvements			Total	%
	Liquide pleural	Liquide articulaire	Autres		
<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	4	0	11	15	50
<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	5	0	0	5	16,67
<i>HAEMOPHILUS influenzae b</i>	2	1	0	3	10
<i>ESCHERICHIA coli</i>	1	0	1	2	6,67
<i>ACINETOBACTER calcovar</i>	2	0	0	2	6,67
<i>PROTEUS mirabilis</i>	0	0	1	1	3,33
<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	0	0	1	1	3,33
<i>SERRATIA odorifera</i>	0	0	1	1	3,33
TOTAL	14	1	15	30	100,00

Sur 54 autres liquides ; nous avons isolé 5 souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, soit une fréquence de 9,25 %.

Au total 30 souches bactériennes pathogènes ont été isolées des autres liquides positives en cultures. *STREPTOCOCCUS pneumoniae* représente 16,67 % de ces souches.

STREPTOCOCCUS pneumoniae a été isolé uniquement dans le liquide pleural.

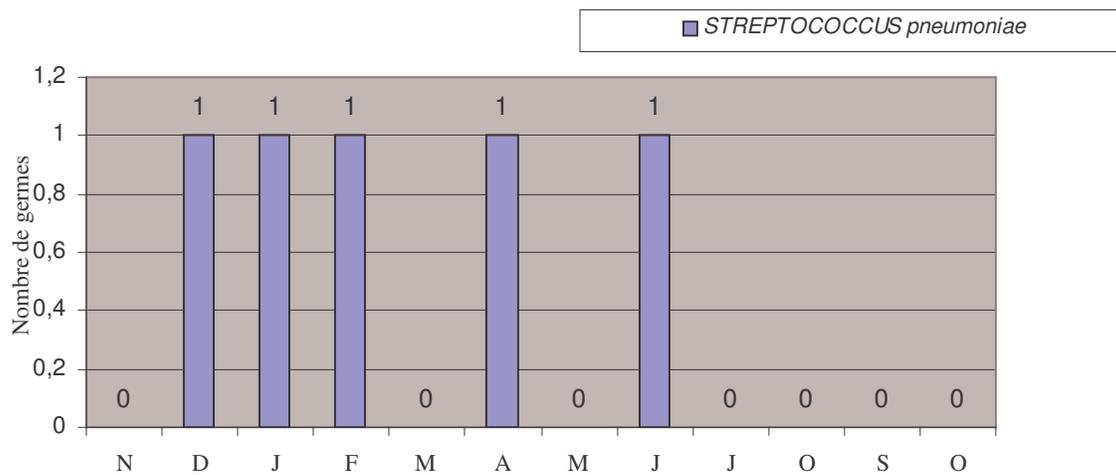


Figure 10 : Fréquence d'isolement dans le liquide pleural de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* selon les mois de la période d'étude

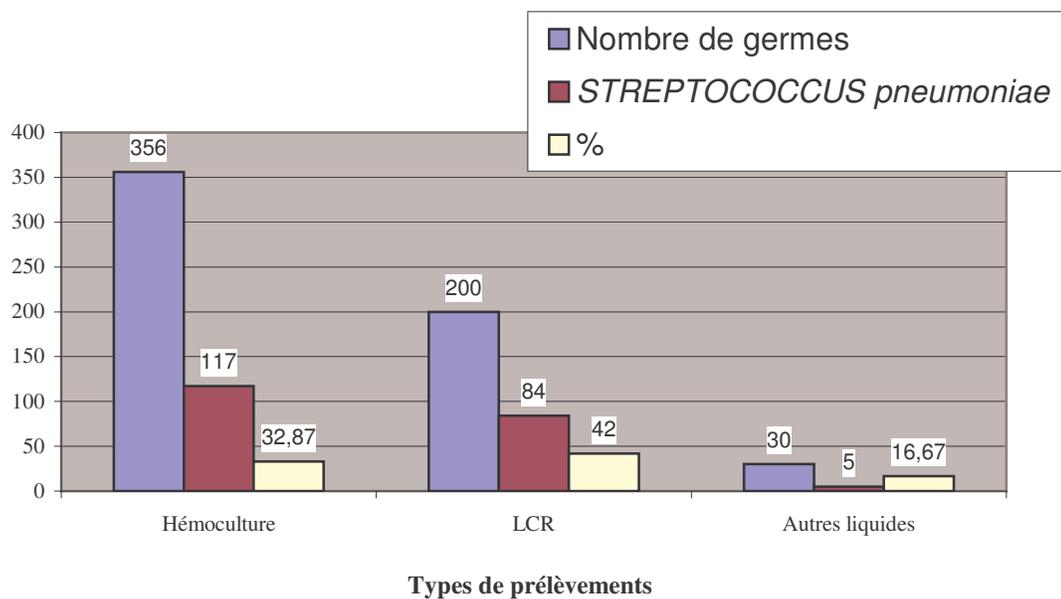


Figure 11 : Fréquence d'isolement de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les différents liquides biologiques de Novembre 2003 à Octobre 2004

Tableau IX : Fréquence d'isolement de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les prélèvements selon les mois de la période d'étude

Prélèvements	Nov 03	Déc 03	Jan 04	Fév 04	Mar 04	Avr 04	Mai 04	Jui 04	Juil
Total des Prélèvements	119	180	119	180	296	332	279	188	20
Pneumococque dans les Prélèvements	6	18	13	12	14	16	10	7	1

La fréquence d'isolement de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* ne dépend pas du nombre de prélèvements reçus.

Tableau X : Fréquence d'isolement des germes selon les mois de l'étude

GERMES	MOIS												Total	%
	N	D	J	F	M	A	M	J	J	O	S	O		
<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	6	18	13	12	14	16	10	7	1	8	7	5	117	31,20
<i>HAEMOPHILUS influenzae b</i>	9	10	6	5	7	8	15	11	12	11	14	7	115	30,67
<i>HAEMOPHILUS parainfluenzae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe A	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	4	1,07
<i>STREPTOCOCCUS</i> groupe B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>STREPTOCOCCUS</i> non hémolytique	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>STREPTOCOCCUS</i> alpha hémolytique	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>STAPHYLOCOCCUS aureus</i>	0	1	1	1	2	10	4	1	2	2	2	4	30	8,00
<i>SALMONELLA Typhi</i>	0	1	0	2	3	1	1	1	1	1	1	0	12	3,20
<i>SALMONELLA spp</i>	4	2	0	1	3	3	2	0	3	2	2	9	31	8,27
<i>SALMONELLA arizonae</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>SALMONELLA paratyphi A</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>SALMONELLA paratyphi B</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	5	2	9	2,40
<i>SALMONELLA paratyphi C</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,27
<i>ESCHERICHIA coli</i>	0	0	2	2	1	2	3	0	1	3	0	1	15	4,00
<i>CITROBACTER freundii</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0,53
<i>CITROBACTER species</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,27
<i>ENTEROCOCCUS spp</i>	0	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0	1	5	1,33
<i>ENTEROBACTER cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,27
<i>ACINETOBACTER calcovar</i>	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	4	1,07
<i>PROTEUS mirabilis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>MORGANELLA morganii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>SERRATIA odorifera</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0,27
<i>KLEBSIELLA pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	3	0,80
<i>PSEUDOMONAS spp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,27
<i>PSEUDOMONAS aeruginosa</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0,53
<i>PSEUDOMONAS putida</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,27
<i>Bacille Gram Négatif</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,27
<i>NEISSERIA meningitidis W 135</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,27
<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe A	0	0	0	2	2	4	0	0	0	0	0	0	8	2,13
<i>NEISSERIA meningitidis</i> groupe C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0,27
<i>FLAVOBACTERIUM meningosepticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,27
Total 1	19	32	25	27	37	51	40	21	23	31	36	33	375	100,00
Contaminants														
SNA	9	8	6	18	17	23	23	6	13	3	10	13	149	
BGP	1	2	2	2	5	6	5	4	2	0	1	2	32	
Total 2	10	10	8	20	22	29	28	10	15	3	11	15	181	
TOTAL (1+2)	29	42	33	47	59	80	68	31	38	34	47	48	556	

STREPTOCOCCUS pneumoniae et *HAEMOPHILUS influenzae* type b sont les principaux germes de méningites bactériennes à l'absence des périodes d'épidémie de méningites à *NEISSERIA meningitidis* les principaux contaminants sont : *STAPHYLOCOCCUS* non *aureus* et les bacilles Gram positifs.

3. Profil antibiotique des souches

Tableau X : Profil antibiotique des souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* isolées au cours de la période d'étude

Germes	Nombre	Pourcentage de sensibilité des antibiotiques testés							
		Peni G/ Oxa		Ceftri		Chlor		Ery	
		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
<i>STREPTOCOCCUS pneumoniae</i>	117	114	97	108	92	110	94	102	87

STREPTOCOCCUS pneumoniae reste sensible aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement des infections invasives en pédiatrie et répondant à une politique de santé publique (Penicilline G = 97 %, Ceftriaxone = 92 %, Chloramphénicol = 94 % et Erythromicine = 87 %).

I

4. Résultat du typage des souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae*

Tableau XI : Sérotype de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* isolés de Février 2002 à Mars 2003 au laboratoire de l'HGT

N° d'ordre	N° Dossier/ Souche	Sérotype	N° d'ordre	N° Dossier/ Souche	Sérotype
1	14	5	28	1407	19 F
2	24	2	29	1420	7 F
3	194	2	30	1457	7 F
4	326	2	31	1509	5
5	326	5	32	1601	2
6	327	1	33	1748	5
7	482	7 F	34	1847	5
8	486	2	35	1853	19 F
9	536	19 F	36	1856	5
10	558	5	37	1885	5
11	614	7 F	38	1900	7 F
12	632	6 A	39	1907	19 F
13	640	19 F	40	1924	5
14	642	9 V	41	1967	9 V
15	711	5	42	1976	9 V
16	887	7 F	43	1978	5
17	898	5	44	2055	19 F
18	903	1	45	2098	5
19	917	5	46	2101	5
20	920	19 F	47	2162	5
21	1035	7 F	48	2235	5
22	1203	5	49	2317	5
23	1247	5	50	2320	5
24	1255	5	51	2324	5
25	1270	7 F	52	2327	5
26	1290	6 A	53	2429	5
27	1360	5	54	2433	5

Les sérotypes 5 est le plus fréquent (27 souches soit 50 %). Il est suivi du sérotype 7 F (8 souches soit 14,81 %), du sérotype 19 F (7 souches soit 12,96%) et du sérotype 2 (5 souches soit 9,25 %)

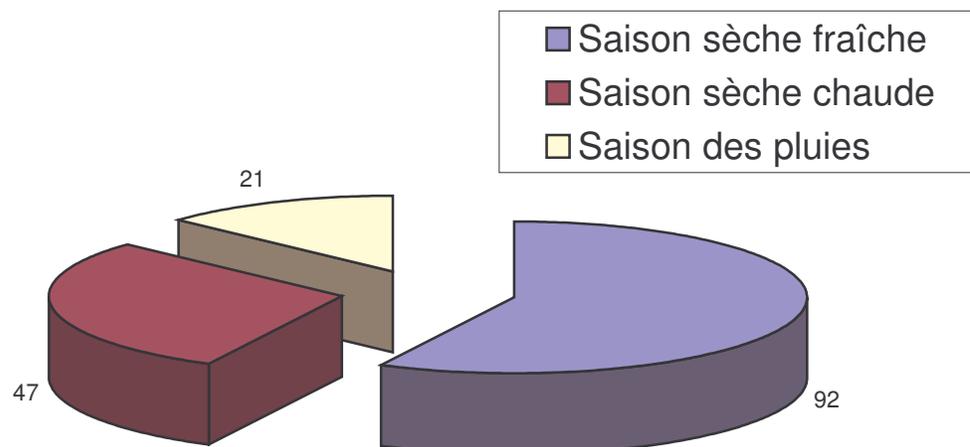
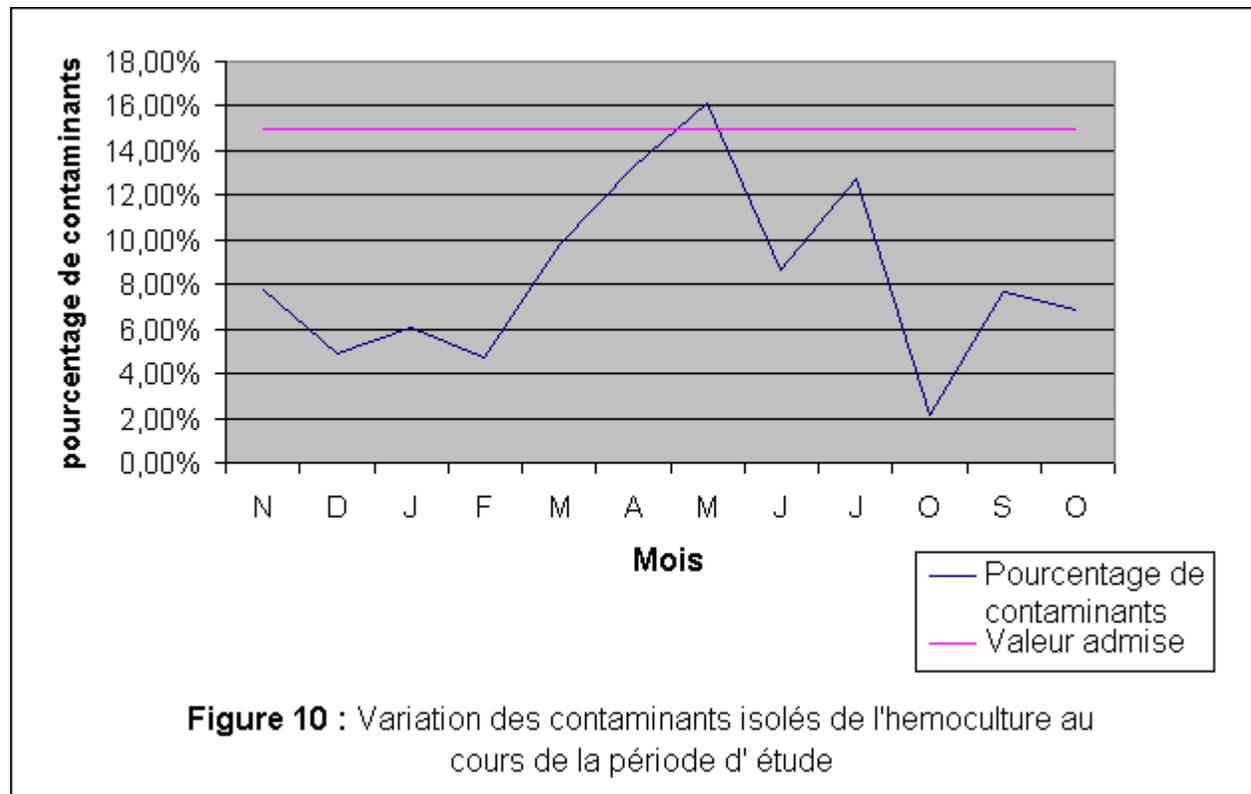
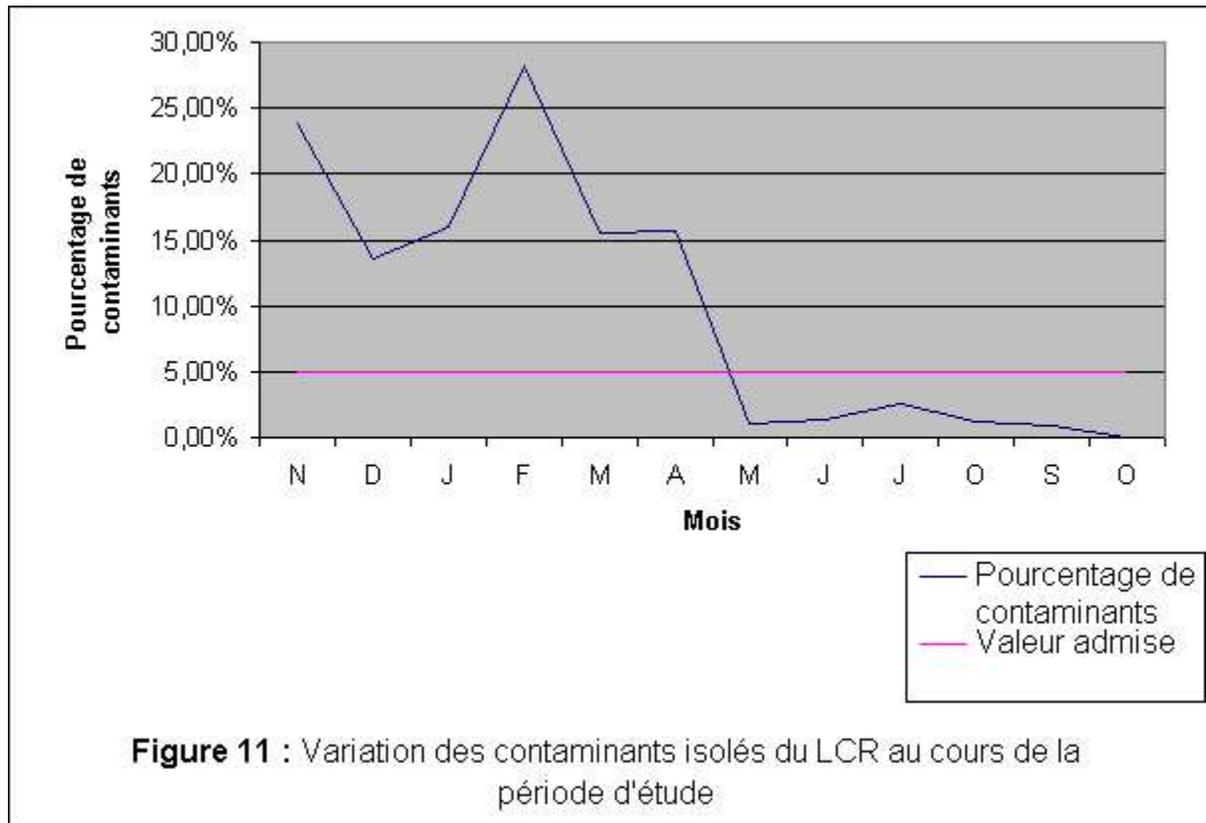


Figure 12 : Répartition saisonnière des cas de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* isolés de Novembre 2003 à Octobre 2004

Mois	N	D	J	F	M	A	M	J	J	O	S
Pourcentage de contaminants	7,79%	4,90%	6,06%	4,76%	9,77%	13,27%	16,09%	8,62%	12,71%	2,13%	7,64%
Valeur admise	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%	15%



Mois	N	D	J	F	M	A	M	J	J	O
Pourcentage de contaminants	23,81%	13,51%	16,00%	28,17%	15,52%	15,63%	1,03%	1,43%	2,53%	1,22%
Valeur admise	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%



La mise en culture du LCR dans le bouillon bactec favorise le développement rapide des contaminants au détriment des germes pathogènes de Novembre 2003 à Avril 2004. Cette situation est résolue par une culture directe du LCR sur les milieux solides.

COMMENTAIRES ET DISCUSSIONS

Du point de vue de la méthodologie

L'étude prospective de diagnostic de laboratoire des infections bactériennes invasives en cours concerne les prélèvements apportés de la pédiatrie sur lesquels un examen bactériologique est fait.

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

Les hémocultures sont effectuées dans des bouillons nutritifs mis en incubation dans l'appareil Bactec 9050 BD conçu pour la détermination rapide des bactéries, des champignons et d'autres microorganismes présents dans les hémocultures cliniques. La surveillance de ces hémocultures est programmée volontairement sur une durée de 5 jours, alors que les hémocultures classiques peuvent aller de 7 à 10 jours.

Le volume de sang est de 5 ml pour l'utilisation du Bactec 9050, par contre elle est de 10 ml dans l'hémoculture classique.

L'intervention de l'utilisateur et les manipulations sur des bouteilles qui consistent à faire la coloration de Gram en fonction de la turbidité observée sur les hémocultures dans la méthode classique, sont minimisées dans la méthode du Bactec. En effet cette dernière est basée sur l'incubation, l'agitation de toutes les cultures et un signal immédiat des positifs par les

voyants lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore... tout ce qui concourt à diminuer le risque d'erreur humaine.^[6]

Un examen préliminaire est fait sur le liquide céphalo- rachidien, les hémocultures positives et les autres liquides biologiques dont le résultat est porté immédiatement à la connaissance des prescripteurs.

Dans le traitement du LCR, des techniques complémentaires comme les tests d'agglutination latex, la cytologie (notamment le comptage des globules blancs et des globules rouges) aident aux résultats préliminaires. Il n'a pas été pratiqué d'examens chimiques du LCR (glycorrachie, protéinorachie, chlorurorachie) contrairement à l'INRSP.

Le résultat du Gram, s'il est positif permet un choix judicieux des milieux de culture. Pour les CGP on utilise une gélose au sang de cheval ou de mouton et une gélose chocolat. Pour les BGN, en plus de ces deux milieux on ajoute une gélose Mac ConKey.

Les ruptures en milieux de culture d'exportation (de France) et les milieux de culture préparés localement mais qui sont souvent contaminés sont des problèmes majeurs à la technique bactériologique.

L'évaluation du coût des différentes analyses : hémocultures, examen cyto-bactériologique du LCR et les examens bactériologiques des autres liquides biologiques devrait prendre en compte le coût des flacons Bactec, des milieux de culture, des réactifs d'identification, des disques d'antibiotiques et facteurs de croissance, des consommables divers, de la technologie utilisée, des charges de fonctionnement etc... toute chose qui rend le coût élevé. Il serait largement supérieur au 120 B (actes de Biologie) pour l'hémoculture, 80 B pour l'examen cyto-bactériologique du LCR pour ne

citer que ceux là évalués dans la nomenclature des actes de biologie^[12]. Dans le secteur public le coût est de 7000 Fcfa pour l'hémoculture (source INRSP : culture = 3500 F et antibiogramme = 3500 F), le LCR est gratuit par contre il s'élève à 10000 F Cfa pour l'hémoculture, pour le LCR (culture = 6000 F, glycorrachie =2000 F, protéinorachie = 2000 F) dans le secteur privé. Cette nomenclature prend en compte les éléments techniques et l'importance de l'examen biologique en question dans la politique de santé publique d'un pays.

Du point de vue des résultats

Au terme de notre étude, nous avons obtenu les résultats suivants :

Un total de 1633 flacons Bactec ont étéensemencés en hémoculture : 356 flacons sont sorties positifs avec germes dont 117 *STREPTOCOCCUS pneumoniae* soit 32,86 %, 145 flacons positifs avec contaminants et 1098 flacons négatifs.

Sur 1027 LCRensemencés, de Novembre 2003 à Avril 2004 481 ont été cultivés sur bouillon Bactec avec 256 bouillon Bactec sortis négatif et 225 bouillons Bactec positifs. Parmi ces bouillons positifs 126 cultures finales ont donné des germes pathogènes dont 69 *STREPTOCOCCUS pneumoniae* soit 30,66 %, 15 cultures négatives et 84 cultures avec contaminants soit 37,33 % contre 5 % de valeur admise. De Mai 2004 à Octobre 2004, 546 LCR ont été directement cultivés sur milieux solides dont 466 cultures négative, 80 cultures positives. Parmi ces culture positives 74 ont donné des germes pathogènes dont 15 *STREPTOCOCCUS pneumoniae* soit 20,27 % et 6 été des contaminants soit 1,09%.

Initialement les LCR étaient ensemencés dans des bouillons Bactec. Ce bouillon Bactec favorise le développement des *Staphylococcus* à coagulase négative essentiellement et d'autres contaminants comme les Bacilles Gram positif. Ceci a contribué à augmenter le taux des contaminants du LCR. Ce changement de technique n'influe pas directement sur l'identification des germes.

Lorsque le Gram sur le LCR direct est positif, il existe alors une bonne corrélation entre les tests d'agglutinations et les cultures positives dans 72 % des cas. Ce contexte, dans bien des cas correspond à une cellularité supérieure à 150 globules blancs/ ml de LCR. Le contexte clinique est bien alors évocateur de méningites. Les services cliniques et la biologie suivent en temps réel l'évolution du patient.

Sur 54 autres liquides biologiques ensemencés, 21 cultures ont été négatives, 33 cultures ont été positives avec 30 germes dont 5 *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les liquides pleurals et 3 contaminants.

Nos résultats confirment la prédominance de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* suivi de *HAEMOPHILUS influenzae* type b comme principales bactéries responsables de méningites et des autres infections invasives chez les enfants. Elles constituent une triade en cas d'épidémie à *NEISSERIA meningitidis* comme signalé dans la thèse de MADANIOU à Bamako en 2003 ^[20]. Dans une moindre mesure suivent les *SALMONELLA*, les *STAPHYLOCOCCUS aureus* et les *ESCHERICHIA coli* comme autres bactéries impliquées dans les méningites.

La sensibilité des antibiotiques sur *STREPTOCOCCUS pneumoniae* a été déterminée à partir de l'abbaque du Comité de la Société Française de Microbiologie édition. Janvier 2004.

Malgré les craintes de l'antibiorésistance en nette croissance *STREPTOCOCCUS pneumoniae* ne pose pas de problème de résistance à l'hôpital Gabriel TOURE en ce qui concerne la sensibilité aux antibiotiques testés.

MBONDA à Bamako en 2004 ^[22] trouve 85,4 % de sensibilité pour la Peni G contre 97 % dans notre étude.

Sur les 54 souches de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* isolées dans le laboratoire CVD- Mali à l'HGT, un sérotypage a été fait au Laboratorio Pneumococcus Instituto de Salud Plublica à Santiago au Chili. De ces études de sérotypage effectuées se degage une approche des sérotypes au Mali. Les résultats sont les suivants :

Sérotype 5 : 27 soit 50 %

Sérotype 7 F : 8 soit 14,81 %

Sérotype 19 F : 7 soit 12,96 %

Sérotype 2 : 5 soit 9,25 %

Sérotype 9 V : 3 soit 5,55 %

Sérotype 1 : 2 soit 3,70 %

Sérotype 6 A : 2 soit 3,70 %

Ces sérotypes retrouvés au Mali ont été comparés à d'autres sérotypes retrouvés ailleurs en Afrique et en Amérique.

Au Mali le sérotypes 5 représente 50 % des souches isolées suivis de 7 avec 15 % et 19, 13 %. Ailleurs en Afrique on note 24 % pour le sérotype 6, 19 % pour le sérotype 14 et 13 % pour le sérotype 1. Au Canada le taux du sérotype 14 est de 28 %, ce du sérotype 6, 17 % et sérotype 19, 14 %.

La fréquence de ces sérotypes dépend de la réalité de chaque pays

Les bactéries responsables de méningites sont retrouvées en toute saison avec une légère recrudescence de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* en saison sèche fraîche pendant les mois de novembre, décembre, janvier et février. Il est établi que dans les pays sahéliens les réveils épidémiques concernent la saison sèche chaude pour *NEISSERIA meningitidis* alors que *STREPTOCOCCUS pneumoniae* et *HAEMOPHILUS influenzae* b persistent toute l'année à Bamako selon Oumou KONE en 1999.^[17]

De même selon MOUTON. Et al. , les infections à pneumocoques prédominent de novembre à mai.^[23]

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Au terme de notre étude 2714 prélèvements divers ont été examinés et ont permis d'isoler 375 germes pathogènes. *STREPTOCOCCUS pneumoniae* représente 117 cas soit 31,20 % des isolats. *STREPTOCOCCUS pneumoniae* a été isolé dans 117 cas des hémocultures soit 7,16 % de l'ensemble des hémocultures , 84 du LCR soit 8,17 % et 5 des autres liquides biologiques soit 9,25 %.

STREPTOCOCCUS pneumoniae reste sensible à la Pénicilline G (97 %), à la Ceftriaxone (92 %), au Chloramphénicol (94 %) et à l'Erythromicine (87%).

Les sérotypes rencontrés : 5, 7F, 19F, 2, 9V, 1, 6A sont de nature à être optimiste pour la vaccination des populations cibles.

De cette étude une répartition saisonnière montre une augmentation des cas de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* pendant les mois de novembre à mai.

Vu le fardeau que fait peser l'infection à *STREPTOCOCCUS pneumoniae* sur les enfants, une stratégie vaccinale doit être envisagée.

Il existe plusieurs vaccins anti- pneumococciques dont le Pneumo- 23 qui est un vaccin non conjugué, il couvre les différents sérotypes retrouvés au Mali sauf le 6A qui ne représente que 3,70 % sur les 54 souches sérotypées. Par conséquent ce vaccin peut avoir une efficacité élevée et peut protéger les enfants dès l'âge de 2 ans. Le nouveau vaccin 11 Valents, vaccin conjugué pourrait être plus efficace car il prend en comptes les réalités de chaque pays, il est encours d'étude. Nos données pourront aider le gouvernement

pour une prise de décision de l'introduction rapide de la vaccination dans le Programme Elargi de Vaccination (PEV) de routine au Mali contre les sérotypes les plus fréquents.

Ceci nous conduit aux recommandations suivantes :

Aux autorités de l'Hôpital Gabriel TOURE

- développer les activités bactériologiques indispensables pour un hôpital Hospitalo- Universitaire de 3^{ème} Référence.

Au Ministère de la santé

- renforcer la coopération scientifique et technique avec nos partenaires Américains du CVD Baltimore (Université de Maryland- USA)

- rendre disponible le vaccin anti- pneumococcique dans les protocoles de prévention chez tous les sujets à risque (enfants surtout) avant la saison froide de l'année.

BIBLIOGRAPHIE

1. **AVRIL. J. L Prof, BABERNANT. H Prof, DENIS. F Prof, MONTEIL. H Prof.** Bactériologie Clinique. 3^e édition Ellipses édition Marketing SA, 20032, rue Bague 75740 Paris cedex 15, p59, 62, 64, 66, 69, 70, 71, 72
2. **Azèle FERRON.** Bactériologie Médicale à l'usage des étudiants en médecine. 10^e édition 1979 par les professeurs et maîtres de conférences de microbiologie médicale p16-3,4
3. **Azèle FERRON.** Bactériologie Médicale à l'usage des Etudiants en Médecine. 12^e édition 1984 par les Professeurs de Bactériologie médicale édition C et R 79, rue Faidherbe J 9110 La Madelain p105, 106
4. <http://www.bacterio.cit.fr/bacdico/ss/pneumoniae.html>
5. <http://www.bact.wisc.edu/Bact330/pneumoniae.html>
9. **bioMérieux B. V.** Bactériologie Mars 2003. Réf. 247003.
6. **Becton, Dickinson and Company.** BACTECTM 9050, Manuel de l'utilisateur du système. Réf. 445845 du 09/2004.
7. **BERCHE. P , GAILLARD. J. L , SIMONET. M.** Les Bactéries des Infections Humaines. Médecine Science Flammarion 4, rue Casimir Delavigne 75006 Paris 1988. p 304
8. **BHE :** Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire N° 1/1993.
9. **bioMérieux B. V.** Bactériologie Mars 2003. Réf. 247003.

10. **BONNET E, GANDOIS J. M et MARCHOU B.** Infections à Streptocoques. Encyclopedie médico -chirurgicale Edition scientifique et médicale Elsevier SAS, Paris, Maladies Infectieuses, 8-009-A-10, 2002, 29p

11. **CAMPBELL. J. D MD, KOTLOFF. K. L MD, SOW. S. O MD,MS.**
The Pediatric Infectious Disease Journal. Volume 23, Number 7, July 2004.
Invasive Pneumococcal Infections Among Hospitalized Children in Bamako, Mali.

12. **CAQUET R.** Guide pratique des examens de laboratoire. 6^{ème} Edition Paris, 1994

13. **14^{ème} COURS D'EPIDEMIOLOGIE APPLIQUEE POUR CADRES SUPERIEURS DE LA SANTE.** Rapport d'enquête , Place de l'haemophilus influenzae b dans les méningites bactériennes à l'INRSP, Bamako 2002 -2004

14. **DEMBELE. A.** Méningites purulentes du nouveau- né de 0 à 60 jours. Thèse Médecine Bamako 2001, 01-M-74.

15. **FAUCHERE. J. L.** Bactériofiches, Techniques en Bactériologie Clinique, Ellipses / édition marketing S. A., 1997 32 rue Bargue, Paris 15^e édition.

16. **FLANDROIS. J. P.** Bactériologie Médicale. Collection Azay ISBN : 2-7297-0567-8 Presses Universitaires de LYON, 1997 86 rue Pasteur - 69365 Lyon cedex 07 p115, 117

17. **KONE. O.** Approche épidémio - clinique des méningites purulentes observées en pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE de 1994 à 1998. Thèse Médecine Bamako 1999

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

18. **LECLERC. H.** Microbiologie générale. 2^{ème} Edition, 1983. p199, 202
19. **LE MINOR. L, VERON. M.** Bactériologie Médicale. 2^e édition, 1989, p 795, 796
20. **MADANIOU. A.** Aspect épidémiologique et bactériologique des méningites purulentes au Mali de 1979 à 1999. Thèse Pharmacie Bamako 2003
21. **MBANDA. T. S. L.** Infections bactérienne à Streptococcus pneumoniae dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel TOURE, Février 2002 à Février 2003. Thèse Médecine, Bamako 2004
22. [http :// www. Microbe-edu.com/etudiants/streptocoques.html](http://www.Microbe-edu.com/etudiants/streptocoques.html)
23. **MOULTON. Y, BRION. M.** Infections à pneumocoque. Encyclopedie Médico -Chirurgicale Paris, Maladies Infectieuses, 8012A-10,5-1979. p1, 3
24. **MURRAY. P. R, HOLLICK. G. E, JERRIS. R. C, WILSON. M. L.** Journal of Clinical Microbiology, June 1998, p 1601- 1603.
- 25 **Rapport annuel** 2002 - 2003 C.V.D- Mali - Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM).
- 26.http://trans.voilà?systran_1p=en_fr&systran_id.../ch013.htm&systran_f=108058398

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : MARIKO

Prénom : Ramata

Titre de la thèse : Place de *Streptococcus pneumoniae* isolé au laboratoire CVD des infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans les services de pédiatrie Gabriel TOURE.

Année Universitaire : 2004 - 2005

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

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

Secteurs d'intérêt : Bactériologie, Santé publique, Vaccinologie, Pédiatrie.

RESUME

Il s'agit d'une étude prospective portant sur l'examen bactériologique des prélèvements effectués chez des enfants de moins de 17 ans hospitalisés dans les services de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE. Cette étude s'étend sur la période de Novembre 2003 à Octobre 2004 s'inscrivant dans une étude prospective de CVD en cours depuis Février 2002.

Elle vise à déterminer la place de *Streptococcus pneumoniae* parmi les germes isolés des examens bactériologiques.

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

Nous avons obtenu les résultats suivants :

- Nombre total de prélèvements effectués (hémocultures, LCR , Autres liquides biologiques) : 2714.
- Nombre total d'hémocultures : 1633 soit 60,17% des prélèvements.
- Nombre de flacons de Bactec positif 535 soit 32,76 %
- Nombre de germes isolés des hémocultures : 356 soit 66,54 % des flacons positifs et 21,80 % de l'ensemble des prélèvements d'hémocultures.
- Taux de contaminants des hémocultures : 145 soit 8,88 %.
- Nombre de flacons de Bactec positifs ayant « in fine » donné une culture stérile 34 soit 2,8 %.
- Nombre total de LCR : 1027 soit 37,84 % des prélèvements.
- Nombre de cultures de LCR positives 290 soit 28,24 %.
- Nombre de cultures de LCR négatives 737 soit 71,76 %
- Nombre de germes isolés des LCR : 200 soit 19,47 %.
- Taux de contaminants des LCR : 90 soit 8,76 % .
- Autres liquides biologiques 54 soit 1,99 %.

Fréquence d'isolement des principaux germes :

- 117 *Streptococcus pneumoniae*, soit 31,20 % avec des pics en saison sèche fraîche 92 cas pendant les périodes de Novembre à Février.

- 115 *Haemophilus influenzae type b* soit 30,67 %.
- 31 *Salmonella Typhi* soit 8,27 %.
- 30 *Staphylococcus aureus*, soit 8 %
- 15 *Escherichia coli* soit 4 %

Streptococcus pneumoniae reste sensible à la Pénicilline G (97 %), à la Ceftriaxone (92 %), au Chloramphénicol (94 %) et à l'Erythromicine (87 %).

Le vaccin pneumococcique 23- valents couvre presque les sérotypes retrouvés au Mali (5, 7F, 19F, 2, 9V, 1, 6A). Ces sérotypes sont de nature à être optimiste pour la vaccination des populations cibles.

De cette étude se dégage une saisonnalité particulière. En effet les infections à *Streptococcus pneumoniae* sont très fréquentes pendant les mois de novembre à mai.

MOTS CLES : *Streptococcus pneumoniae* , Méningites, Hémoculture, LCR, Pédiatrie, Vaccination.

IDENTIFICATION SHEET

Family name : MARIKO

First name : Ramata

Title of thesis : Bacteriological characteristics and place of *STREPTOCOCCUS pneumoniae* isolated in invasive bacterial infections about in- patient children in Gabriel TOURE's pediatrics department.

Academic year : 2004 - 2005

Place of defense : Bamako

Country of origin : Mali

Deposit place : Bibliotheque de la Faculte de Medecine, de Pharmacie
et d'Odonto- Stomatologie (Library of Medecine, Pharmacy
and Ondotostomatology Faculty)

Interest sectors : Bacteriologie, Public Health,, Vaccinologie, Pediatrics.

Summary

It's about a prospective study on bactriological examinations of samples taken on in- patient children of less than 17 years in Gabriel TOURE's pediatrics department. This study covers the period from November 2003 to October 2004 being part of current CVD prospective study since February 2002.

Its aims is to determine the place of *STREPTOCOCCUS pneumoniae* among isoleted germs of bactriological examinations.

MARIKO Ramata, CVD- Mali/HGT/Thèse de Pharmacie 2005

We got the following results :

- Total number of samples taken (blood culture, cerebrospinal fluid, other biological fluids) ; 2714.
- Total number of blood culture : 1633, that is to say 60,17 % of samples.
- Number of positive Bactec small bottles 535, that is to say 32,76 %.
- Number of blood culture isolated germs : 356, that is to say 66,54 % of positives small bottles and 21,80 % of the blood samples culture.
- Rate of infectious blood culture : that is to say 145, 8,88 %.
- Number of positive Bactec small bottles having *in fine* given a sterile culture 34, that is to say 2,8 %.
- Total number of cerebrospinal fluid : 1027, that is to say 37,84 % of samples.
- Number of positive cerebrospinal fluid cultures 290, that is to say 28,24 %.
- Number of negative cerebrospinal fluid cultures 737, that is to say 71,76 %.
- Number of cerebrospinal fluid isolated germs : 200, that is to say 19,47 %.
- Number of infectious cerebrospinal fluid : that is to say 90, 8,76 %.
- other biological fluids 54, that is to say 1,99 %.

Isolation frequency of main germs :

- 117 *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, that is to say 31,20 % with peaks in fresh dry season 92 cases for the periods from November to February.
- 115 *HAEMOPHILUS influenzae* type b that is to say 30,67 %.
- 31 *SALMONELLA Typhi* that is to say 8,27 %.
- 30 *STAPHYLOCOCCUS aureus*, that is to say 8 %.
- 15 *ESCHERICHIA coli* that is to say 4 %.

STREPTOCOCCUS pneumoniae remains sensible to la Penicilline G (97 %), to ceftriaxone (92 %), to chloramphenicol (94 %) and to Erythromycine (87 %).

The vaccine pneumococcic 23 valents covers almost the serotypes in Mali (5, 7F, 19F, 2, 9V, 1, 6A). These serotypes is likely to be optimistic for the vaccination of the target populations.

From this study particular is released. Indeed the infections with *Streptococcus pneumoniae* are very frequent during November to May.

Key words : *STREPTOCOCCUS pneumoniae*, Meningitis, blood culture, cerebrospinal fluid, Pediatrics, Vaccination.

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.

