

**République du Mali**

*Un peuple-Un but-Une foi*

**Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako**



Année académique 2017-2018

**Thèse N° .....**

**Contribution à la surveillance de la résistance aux  
antimicrobiens des souches de *Streptococcus pneumoniae*  
isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à  
Bamako au Mali**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le 12 /07/2018 devant la  
Faculté de Pharmacie

**Par M. Hamidou KAMATE**

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

**Jury**

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Pr Sounkalo DAO  
Dr Lassina Gadi TIMBINE  
Dr Nouhoum SANGARE

Co-directeur : Dr Ibrehima GUINDO

Directeur : Pr Souleymane DIALLO

**Contribution à la surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à Bamako au Mali.**

## **ADMINISTRATION**

**Doyen : Boubacar TRAORE, Professeur**

**Vice-doyen : Ababacar MAIGA, Professeur**

**Secrétaire principal : Seydou COULIBALY, Administrateur civil**

**Agent comptable : Famalé DIONSAN, Inspecteur des finances.**

## **PROFESSEURS HONORAIRES**

Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
Mahamadou	CISSE	Biologie
Daouda	DIALLO	Chimie Générale et Minérale
Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
Moussa	ARAMA	Chimie Organique
Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
Alou A	KEITA	Galénique
Mamadou	KONE	Physiologie
Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
Bréhima	Koumare	Bactériologie/Virologie
Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
Elimane	MARIKO	Pharmacologie

## **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

Mounirou	BABY	Hématologie
Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
Abdoulaye	DABO	Biologie/Parasitologie
Alassane	DICKO	Santé Publique
Amagana	DOLO	Parasitologie-Mycologie
Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
Boubacar	TRORE	Parasitologie-Mycologie

### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie-Mycologie
Akory Ag	IKANANE	Santé Publique/ Nutrition
Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>Chef de DER</b>
Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé environnement

### 3. MAITRE ASSISTANT/CHARCHE DE RECHERCHE

Charles	ARAMA	Immunologie
Seydina S. A	DIAKITE	Immunologie
Aldjouma	GUINDO	Hématologie
Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
Kassoum	KAYENTAO	Santé publique/Biostatistiques
Issaka	SAGARA	Santé Publique/Biostatistiques
Fanta	SANGHO	Santé Publique/Santé Communautaire
Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/Biostatistiques

#### 4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

Seydou Sassou	Coulibaly	Biochimie Clinique
Djénéba	Coulibaly	Nutrition/Diététique
Djibril Mamadou	Coulibaly	Biochimie Clinique
Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie/Moléculaire
Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie médicale
Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
Kléitgui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
Issa	DIARRA	Immunologie
Fatou	DIAWARRA	Epidémiologie
Yaya	GOITA	Biochimie Clinique
Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
Oumar	GUINDO	Epidémiologie
Falaye	KEITA	Santé Publique/Santé environnement
N'Deye Lallah Nina	KOITA	Nutrition
Birama Apho	LY	Santé Publique
Yacouba	MAIGA	Bio statistique
Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie- Mycologie
Dinkorma	OULOGUEM	Biologie Cellulaire
Samba Adama	Sangaré	Bactériologie
Oumar	SANGHO	Epidémiologie
Diakaridia	TRAORE	Hématologie

## **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

### **1. POFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
Saibou	MAIGA	Législation
Rokia	SANOGO	Pharmacognosie

**Chef de  
DER**

### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Néant - -

### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

Loséni	BENGALY	Pharmacie hospitalière
Moussa	SANOGO	Gestion
Yaya	COULIBALY	Législation
Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

#### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

Bakary Moussa	CISSE	Galénique
Issa	COULIBALY	Gestion
Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie hospitalière
Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion pharmaceutique
Antoine	DARA	Sciences pharmaceutiques
Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
Adama	DENOU	Pharmacognosie
Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
Assitan	KALOGA	Législation
Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
Ahmed	MAIGA	Législation
Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
Aboubacar	SANGHO	Législation
Bourama	TRAORE	Législation
Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques
Sylvestre	TRAORE	Gestion pharmaceutique
Aminata TIEBA	TRAORE	Pharmacie hospitalière
Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie hospitalière

#### **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

##### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
Benoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

## **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Sékou	BAH	Pharmacologie
		<b>Chef de DER</b>

## **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie chimique
Tidiane	DIALLO	Toxicologie

## **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie analytique
Blaise	DACKOUO	Chimie Analytique
Fatoumata	DAOU	Pharmacologie
Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
Madani	MARIKO	Chimie Analytique
Mohamed EL Béchir	NACO	Chimie analytique
Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
Dougoutigui	TANGARA	Chimie analytique
Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

## **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

### **1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE**

Mouctar	DIALLO	Biologie/ <b>CHEF de DER</b>
Cheick F.	TRAORE	Biologie/Entomologie
Mahamadou	TRAORE	Génétique

### **2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRE DE RECHERCHE**

Lassana	DOUMBIA	Chimie appliquée
---------	---------	------------------

### **3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGE DE RECHERCHE**

Néant - -

### **4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE**

Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie organique
Modibo	DIALLO	Génétique
Abdoulaye	KANTE	Anatomie
Boureima	KELLY	Physiologie médicale
Moussa	KONE	Chimie Organique
Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

# **DEDICACES ET REMERCIEMENTS**

## Dédicaces

Je dédie cette thèse...

### **A mon père Salif KAMATE,**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien être. Nous avons besoin de tes bénédictions, que Dieu te garde longtemps auprès de nous.

### **A ma mère Kadiatou TRAORE**

Vous êtes la clarté qui me guide dans la vie, sans vous je n'arriverai jamais à ce jour.

Ce travail est le fruit de tes conseils, de vos innombrables sacrifices

Chère mère que Dieu vous donne longue vie.

### **A mon feu oncle Bourama KAMATE**

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Repose en paix.

### **A mon oncle Gaoussou KAMATE**

J'ai trouvé en toi l'amour d'un père

Merci pour votre générosité, vos conseils nous a permis de réaliser se travail

**A mes frères, sœurs, cousins et cousines :** Aïssata Kamaté, Tidiane Kamaté, Aminata S Kamaté, Abdrahamane S Kamaté, Djeneba S Kamaté, El Hadji Aboubacar siriki S Kamaté, Sidiki Kamaté, Gninoussa Kamaté, Abdoulaye B Kamaté, Alima Kamaté, Soumaïla Kamaté, Yara Kamaté, Asetou Kamaté...

Qu'Allah le tout puissant miséricordieux, préserve notre affection fraternelle et fidèle attachement.

### **A mes amis et collaborateurs**

Antoine Marie Traoré, André Diarra, Jean Pierre Koné, Jean Pierre Dena, Joseph Taré, Ali Malé, Yaya Togo

Merci pour vos conseils, Veuillez accepter notre profonde reconnaissance.

**A mon très chère amie Adjaratou Diarra**

Merci pour les lueurs d'espoir que tu m'as insufflé pendant les moments les plus difficiles.

**A mes oncles et Tantes**

Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond

## **Remerciements**

**A l'endroit de l'ensemble du personnel du CICM** qui n'ont ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail.

En particulier le Pr Souleymane Diallo et le Pr Bourèma Kouriba

Veillez agréer, chers maîtres l'expression de notre profonde reconnaissance.

Aux Dr Lassina Gabi Timbine, Dr Nouhoum Sangaré, Dr Bréhima Traoré, Judicael Ouadrigo, Dr Adjata, Dr Madina Tall

Les mots me manquent pour vous dire combien de fois vous m'avez soutenu

Votre disponibilité, votre esprit scientifique m'a beaucoup inspiré

Ensemble j'ai énormément appris de vous.

A Mme Nana, Mr Issa Soumaré

Merci pour les enseignements reçus,

**A tout le personnel de pharmacie Boulevard de l'indépendance Dr Daye Tall**

**A mes camarades et collègues de la promotion N'Golo Diarra**

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre gaieté me comble de bonheur.

**Aux familles Sidibé, Diabaté au Point-G**

C'est un privilège pour moi à travers ce document d'exprimer ma profonde gratitude.

Merci pour votre accueil.

# **HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre Maître et Président du Jury**

**Professeur Flabou BOUGOUDOGO**

- **Pharmacien Microbiologiste**
- **Maitre de conférences Agrégé en Bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé publique (2005-2012)**
- **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé.**

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

Vos qualités humaines, votre abord facile font de vous un homme admirable. La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail, montre votre disponibilité pour vos étudiants et votre simplicité.

Recevez cher Maître, nos sincères remerciements.

## **A notre Maître et Juge**

### **Professeur Sounkalo DAO**

- **Professeur titulaire de Maladies infectieuses à la FMOS**
- **Chef de DER en médecine à la FMOS**
- **Responsable de l'enseignement des Maladies Infectieuses à la FMOS**
- **Investigateur clinique au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose : SEREFO/FMOS/NIAD**
- **Président de la Société Malienne de Pathologie Infectieuse et Tropicale (SOMAPIT)**
- **Membre de la Société Africaine de Pathologie Infectieuse (SAPI)**
- **Membre de la Société Française de Pathologie Infectieuse et Tropicale (SFPIT).**

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

Votre simplicité, votre modestie, votre sens de l'honneur, votre amour pour le travail bien fait font de vous une référence.

Veillez agréer cher Maître, l'expression de notre profonde gratitude et de notre sincère reconnaissance.

## **A notre Maître et Juge**

### **Docteur Lassina Gadi TIMBINE**

- **Pharmacien Biologiste**
- **Directeur de laboratoire du Centre d'Infectiologie Charges Mérieux(CICM).**

Honorables Maitre, c'est privilège pour nous de vous compter parmi les membres de ce jury de thèse.

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

Nous garderons de vous l'image d'un homme de sciences toujours au chevet de ces étudiants.

## **A notre Maître et Juge**

### **Docteur Nouhoum SANGARE**

- **Pharmacien Biologiste**
- **Responsable de l'unité, Biochimie, Hématologie, Sérologie au Laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) Bamako de (2015-2018).**
- **Biologiste médical à l'unité laboratoire du Centre de Santé de Référence de la commune III depuis (Juillet 2018).**

Cher Maître,

Nous sommes très touchés par l'intérêt que vous avez porté à ce travail mais aussi par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de le juger. Nous sommes fiers d'avoir bénéficié de votre formation.

Trouvez ici cher Maître l'expression de notre attachement et de notre gratitude.

## **A notre Maître et Co-directeur**

### **Docteur Ibrehima GUINDO**

- **Pharmacien Biologiste,**
- **Chef de service du laboratoire de Bactériologie-Virologie à l'INRSP**
- **Maître-assistant de Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie(FAPH).**

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de Codiriger cette thèse malgré vos multiples occupations.

En plus de vos connaissances scientifiques, votre disponibilité et votre simplicité font de vous un homme admirable.

Veillez trouver ici, l'expression de notre vive reconnaissance et notre haute estime.

**A notre Maître et directeur de thèse**  
**Professeur Souleymane DIALLO**

- **Pharmacien Biologiste**
- **Colonel Major à la retraite (Service de Santé des Armées)**
- **Professeur de Bactériologie et de Virologie à la Faculté de Pharmacie(FAPH)**
- **Directeur Général du laboratoire du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux(CICM), Mali (2012-2017).**

Cher Maître,

C'est un grand honneur, que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.

Nous garderons de vous le souvenir d'un excellent Maître, d'un Professeur digne de respect et de considération.

Veillez accepter, l'expression de notre gratitude, tout en vous remerciant de votre disponibilité et de votre générosité.

## Liste des abréviations

**AMP** : Ampicilline

**PEN** : Pénicilline

**AMX** : Amoxicilline

**OXA** : Oxacilline

**VAN** : Vancomycine

**TET** : Tétracycline

**ERY** : Erythromycine

**KAN** : Kanamycine

**GEN** : Gentamycine

**CIP** : Ciprofloxacine

**PEF** : Pefloxacine

**TSU** : Sulfaméthoxazole-triméthoprime

**PRI** : Pristinamycine

**CRO** : Ceftriaxone

**PVC** : Vaccins antipneumococciques

**PPV23** : Vaccins polysaccharidiques pneumococciques 23- valent

**ng** : Non groupable

**ORL** : Oto-rhino-laryngologie

**ANC** : Acide nalidixique -colistine

**NanA** : Neuraminidase A

**LytA** : N-acétylmuramoyl-l-alanine amidase

**LCR** : Liquide céphalo-rachidien

**PLP** : Protéines Liants la Pénicilline

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**BNR** : Résistance de Bas Niveau

**HNR** : Résistance de Haut Niveau

**ErmB** : Erythromycin ribosomal methylase

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal

**MefA** : Mécanisme de résistance par efflux dû au gène(A)

**COS** : Gélose au sang frais

**CNA** : Gélose au sang + colistine et acide nalidixique

**PVX** : Gélose chocolat ou gélose au sang cuit

**MSA** : Gélose Chapman

**PERCH** : Pneumonia Etiology Research for Child Health

## Liste des tableaux

Tableau I: Regroupement des espèces de streptocoques basé sur le séquençage du rRNA. ....	35
Tableau II : Nombre total d'échantillons reçus au laboratoire de 2015-2017 .....	60
Tableau III: Répartition des souches de <i>S.pneumoniae</i> isolées par rapport aux types de prélèvements. ....	61
Tableau IV: Répartition des patients selon le sexe. ....	61
Tableau V: Profil antibiotique des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> face aux $\beta$ -Lactamines. ....	62
Tableau VI : Profil antibiotique des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> face aux Macrolides.....	63
Tableau VII : Autres .....	64

## Liste des figures

Figure 1 : Structure schématique de <i>S. pneumoniae</i> .....	39
Figure 2 : Aspect au microscope optique .....	45
Figure 3 : Aspect de <i>S.pneumoniae</i> sur PVX .....	45
Figure 4: Répartition des germes par saison.....	60
Figure 5 : Profil antibiotique des souches de <i>S. pneumoniae</i> face aux $\beta$ -Lactamines.....	62
Figure 6: Profil antibiotique des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> face aux glycopeptides. ....	63

## **Sommaire**

1	Introduction.....	29
2	Objectifs.....	32
2.1.1	Objectif général.....	32
2.1.2	Objectifs spécifiques.....	32
3	Généralités.....	34
3.1.1	Historique.....	34
3.1.2	Définition et classification.....	34
3.1.2.1	Définition.....	34
3.1.2.2	Classification.....	34
3.1.3	Habitat.....	37
3.1.4	Mode de transmission.....	37
3.1.5	Pouvoir pathogène.....	37
3.1.6	Caractères bactériologiques.....	39
3.1.6.1	Structure.....	39
3.1.6.2	Morphologie.....	40
3.1.6.3	Caractères cultureux.....	40
3.1.6.4	Caractères antigéniques.....	41
3.1.6.5	Caractères biochimiques.....	43
3.1.6.6	Toxines.....	43
3.1.7	Diagnostic bactériologique.....	44
3.1.7.1	Prélèvement et transport.....	44
3.1.7.2	Diagnostic direct.....	44
3.1.7.3	Identification.....	45
3.1.8	Pneumocoques et antibiotiques.....	47
3.1.8.1	Pneumocoques et $\beta$ -Lactamines.....	47
3.1.8.2	Pneumocoques et Aminoglycosides.....	47
3.1.8.3	Pneumocoques et Macrolides.....	48
3.1.8.4	Pneumocoques et Fluoroquinolones.....	48

3.1.8.5	Pneumocoques et Glycopeptides .....	49
3.1.9	Conservation des cultures pures.....	49
4	Méthodologie.....	51
4.1	Cadre de l'étude.....	51
4.2	Type d'étude.....	52
4.3	Période d'étude.....	52
4.4	Population d'étude.....	52
4.4.1	Critères d'inclusion.....	52
4.4.2	Critère de non inclusion.....	52
4.4.3	Echantillonnage.....	53
4.5	Méthodes .....	53
4.5.1	Matériels et réactifs.....	53
4.5.1.1	Examen bactériologiques.....	53
4.5.1.2	Isolement.....	53
4.5.1.3	Identification.....	53
4.5.1.4	Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme).....	54
4.5.2	Prélèvements .....	54
4.5.3	Techniques .....	54
4.5.3.1	Cas de l'hémoculture .....	54
4.5.3.2	Cas des pus.....	55
4.5.3.3	Cas des expectorations.....	55
4.5.3.4	Identification.....	55
4.5.3.5	Antibiogramme .....	55
4.5.3.6	Souchothèque.....	56
4.5.4	Contrôle de qualité.....	56
4.6	Collecte de données.....	57
4.7	Variables étudiées .....	57
4.8	Traitement et Analyses des données .....	57
5	Aspects éthiques .....	57

6	Diagramme de GANTT .....	58
7	Résultats.....	60
8	Discussions .....	66
9	Conclusion et Recommandations .....	69
9.1	Conclusion.....	69
9.2	Recommandations .....	69
10	Annexes: Mode opératoire.....	78

# 1. INTRODUCTION

## 1 Introduction

*Streptococcus pneumoniae* est un des principaux agents pathogènes des voies respiratoires, il provoque une maladie principalement chez les enfants de moins de cinq ans et chez les personnes âgées. Quatre-vingt-dix-huit (98) types capsulaires différents (sérotypes) de pneumocoques ont été rapportés, mais les vaccins antipneumococciques (PCV) incluent des antigènes polysaccharidiques contre seulement 7, 10 ou 13 sérotypes (1).

Les vaccins polysaccharidiques pneumococciques 23-valent (PPV23) sont largement utilisés depuis de nombreuses années, mais des défis subsistent à certains égards, en particulier pour son efficacité parmi les populations à haut risque (2). En mars 2011, le Mali a inclus le vaccin pneumococcique (PCV13) dans la vaccination (3).

Il est donc important de suivre l'émergence de sérotypes en raison de l'expansion clonale des sérotypes non-vaccinés (1).

A l'échelle mondiale, la pneumonie est un grave problème de santé publique et une cause majeure de mortalité et de morbidité. Malgré les progrès dans les traitements antimicrobiens, les tests diagnostiques microbiologiques et les mesures de prévention, la pneumonie reste la principale cause de décès par maladie infectieuse dans le monde. Le nombre croissant de bactéries multirésistantes, les microorganismes difficiles à traiter et l'émergence de nouveaux agents pathogènes constituent un problème majeur pour les cliniciens lorsqu'ils décident de la thérapie antimicrobienne (4).

*Streptococcus pneumoniae* est responsable de plus de 1,5 million de décès par an par suite de pneumonie, de méningite, et de septicémie (5) parmi lesquels environ 800000 décès d'enfants de moins de cinq ans, principalement dans les pays en développement (6).

Par exemple, l'Inde a enregistré environ 35 millions de nouveaux cas de pneumonie en 2010, avec le plus grand nombre de décès dans le monde (390.000), tandis que la Chine a 6 millions de cas et se classe cinquième (7).

Le fardeau sanitaire et la mortalité causés par les infections pendant l'enfance demeurent importants en Afrique subsaharienne. Une revue des causes d'hospitalisation et de décès

chez les enfants admis dans un hôpital d'enseignement pédiatrique à Bamako au Mali a montré la moitié des enfants avaient une maladie fébrile. L'incidence annuelle par 100 000 habitants, les taux de létalité des quatre infections graves les plus courantes, à l'exclusion du paludisme, étaient les suivants: pneumonie, 165 (12%); septicémie, 75 (37%); méningite, 71 (20%); et fièvre entérique, 14 (12%) (8).

Au Mali il existe peu de données sur la composante résistance antimicrobienne de *S. pneumoniae*, les données existantes portent surtout sur les aspects morbidité et la mortalité des infections à *S. pneumoniae*.

Pour contribuer à mieux comprendre l'évolution du niveau de résistances aux antibiotiques de *S. pneumoniae* au Mali afin de contribuer à la surveillance de ces résistances que cette étude a été menée au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux de Bamako.

Les résultats de cette étude permettront aux cliniciens à long terme, de connaître le profil antibiotique des souches de *S. pneumoniae* pour une meilleure thérapie.

## **2. OBJECTIFS**

## **2 Objectifs**

### **2.1.1 Objectif général**

Contribuer à la surveillance de la résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux.

### **2.1.2 Objectifs spécifiques**

- Identifier les souches de *Streptococcus pneumoniae* dans les différents liquides biologiques.
- Déterminer la fréquence d'isolement des souches de *Streptococcus pneumoniae*.
- Déterminer le profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* par rapport aux antibiotiques couramment utilisés.

## **3. GENERALITES**

### **3 Généralités**

#### **3.1.1 Historique**

Isolé de la salive en 1880 par Pasteur, *S. pneumoniae* reste à la première place parmi les causes de mortalité par maladie infectieuse dans les pays développés. La découverte en 1910 des différents types sérologiques de *S. 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 *S. pneumoniae* pouvait être transformée en une souche S (smooth), capsulée et pathogène. En 1944, Avery, MacLeod et McCarty établirent les bases de la génétique bactérienne en montrant que l'ADN est le facteur transformant chez les pneumocoques (9).

#### **3.1.2 Définition et classification**

##### **3.1.2.1 Définition**

*Streptococcus pneumoniae* est un pathogène bactérien à Gram positif qui colonise les surfaces muqueuses du nasopharynx de l'hôte et des voies respiratoires supérieures (10).

- Diplococcus à Gram positif.
- Aspect en diplocoque, lancéolé, en "flamme de bougie" et en courtes chainettes.
- Non sporulé, immobile.

##### **3.1.2.2 Classification**

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

- les Streptocoques bêta-hémolytique: lyse complète des hématies avec destruction complète des stromas globulaires autour des colonies ;
- les Streptocoques alpha-hémolytiques : lyse incomplète, zone plus petite à bords irréguliers avec souvent un reflet verdâtre du milieu de culture (Streptocoques dits « viridans ») ;

- les Streptocoques non hémolytiques.

**Tableau I:** Regroupement des espèces de streptocoques basé sur le séquençage du rRNA (11).

Groupe	Nom du Groupe	Espèces	Sérogroupe de Lancefield
I	Pyogénique	<i>S. pyogenes</i>	A
		<i>S. agalactiae</i>	B
		<i>S. equi</i> , <i>S. dysgalactiae</i>	C
		<i>S. uber</i>	E, C, P, U ou ng (porc)
		<i>S. parauberis</i>	ng (porc)
		<i>S. iniae</i> (dauphins)	ng (dauphins)
		<i>S. canis</i>	L, M
		<i>S. porcinus</i>	P, U, V
		<i>S. intestinalis</i>	ng (porc)
II	<i>Streptococcus</i> Groupe D	<i>S. bovis</i>	D
		<i>S. equinus</i>	D
		<i>S. alactolyticus</i>	D
III	<i>Pneumococcus</i> <i>/viridans</i>	<i>S. pneumoniae</i>	ng
		<i>S. oralis</i>	ng
		<i>S. sanguis</i>	Hou ng

		<i>S. milleri</i> ( <i>S. anginosus</i> ) <i>S. constellatus</i> , <i>S. intermetdius</i>	A, C, F, G ou ng  A, C, F, G ou ng
IV	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>S. mutans</i> <i>S. rattus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. ferus</i> <i>S. macacae</i> <i>S. downei</i>	E ou ng ng ng ng ng ng ng
V	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i>	K ou ng ng ng
VI	Espèces non classées	<i>S. acidominimus</i> <i>S. suis</i>	ng R, S, RS, ou T

ng : Non- groupable

### **3.1.3 Habitat**

Le pneumocoque colonise fréquemment les voies respiratoires de l'homme. 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 (9).

C'est un germe transmis par voie aérienne : la transmission est presque toujours 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 rarement isolé chez les animaux (9).

### **3.1.4 Mode de transmission**

*Streptococcus pneumoniae* fait partie de la flore naturelle des muqueuses. Dès la naissance il colonise le rhino-pharynx. Sous l'influence de certains facteurs, il pourra devenir pathogène et être responsable d'infections respiratoires : (pneumonie franche lobaire aiguë), bronchites, pleurésies, et d'infections ORL : otites, sinusites, mastoïdites (pouvant se compliquer en méningites).

La contamination est interhumaine et se fait par voie respiratoire à partir de porteurs sains ou de personnes malades (12).

### **3.1.5 Pouvoir pathogène**

- La pneumonie franche lobaire aiguë à pneumocoque est la forme classique.

*S. pneumoniae* est responsable de la moitié des pneumonies bactériennes. La mortalité est d'environ 10% des cas. Ces pneumonies et bronchopneumonies sont souvent compliquées de bactériémie ou de méningite. L'hémoculture et la ponction lombaire doivent être faites au moindre doute (11).

Dans l'étude de PERCH (Pneumoniae Etiology Research for Child Health), la pneumonie sévère était définie par la présence de toux ou de difficulté à respirer et l'induration de la paroi thoracique inférieure (13).

Les infections des voies aériennes supérieures, sinusites, otites moyennes aiguës (30% des cas), oto-mastoides sont fréquentes. Elles peuvent se compliquer de méningites, redoutables par les cloisonnements dus à une réaction fibrineuse importante. Un traumatisme crânien entraînant une brèche méningée est un facteur de risque. *S. pneumoniae* est l'espèce bactérienne la plus fréquemment responsable de méningites purulentes chez l'adulte. Elles sont mortelles dans plus de 20% des cas.

On observe plus rarement des péritonites, pleurésies, péricardites et endocardites.

Toutes ces localisations mettent en jeu le pronostic vital.

*S. pneumoniae* est rencontré comme agent de conjonctivites aiguës (11).

Les facteurs de virulence sont :

- La capsule

La capsule polysaccharidique du pneumocoque est largement reconnue comme étant le déterminant majeur de la virulence de cet agent pathogène bactérien.

En plus de l'activité anti-phagocytaire, la capsule polysaccharidique joue le rôle dans la colonisation nasopharyngée en permettant au pathogène d'échapper à l'attachement au mucus des voies respiratoires, interférant ainsi avec l'expulsion du pathogène par l'escalator mucociliaire (14).

Seules les souches capsulées possèdent un pouvoir pathogène expérimental.

Echappement au système immunitaire de l'hôte en résistant à la phagocytose (15).

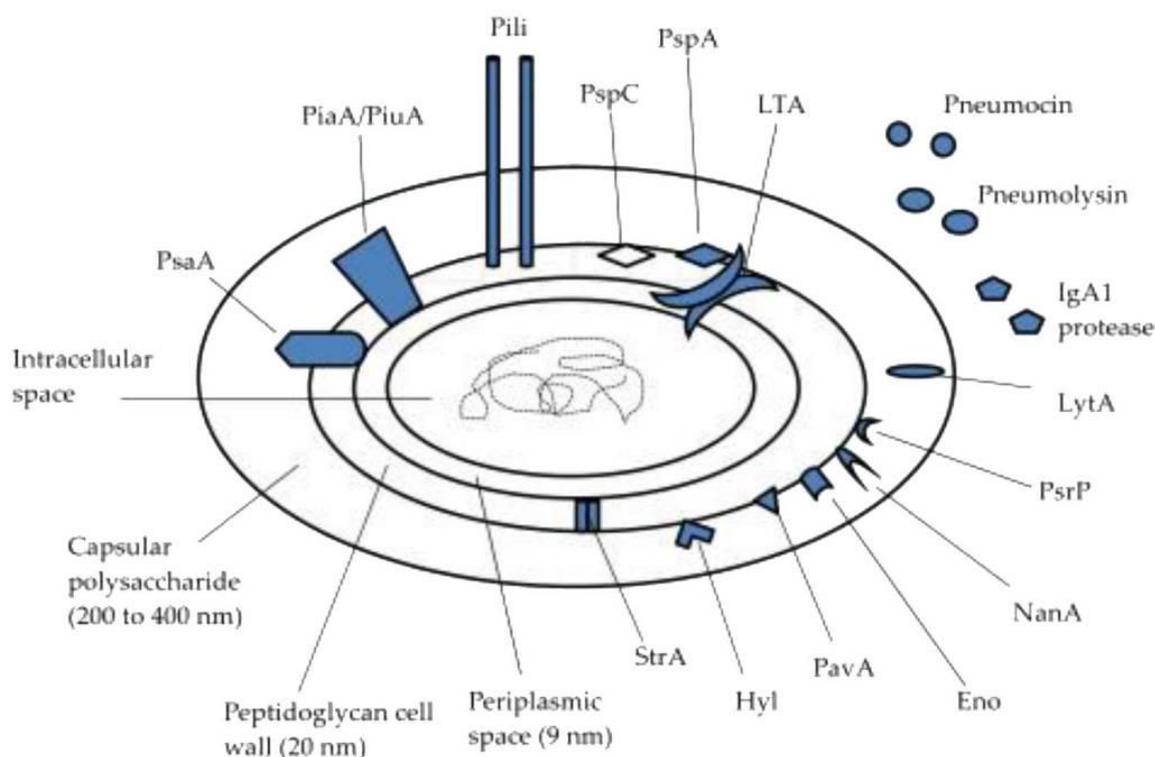
- La pneumolysine

Activité cytotoxique directe vis-à-vis des cellules respiratoires et endothéliales.

Effet pro-inflammatoire par liaison au fragment Fc des Ig et fixation au fragment C1q du complément (15).

### 3.1.6 Caractères bactériologiques

#### 3.1.6.1 Structure



- **Figure 1** : Structure schématique de *S. pneumoniae* (16)

StrA = Sortase A

Hyl = Hyluronate lyase

PavA = Adhérence pneumococcique et virulence

Eno = Enolase

NanA = Neuraminidase

PsrP = Protéine répétée riche en sérine pneumococcique

LytA = Autolysine

LTA = Acide lipoteichoïque.

PspA = Protéine de surface pneumococcique A

PspC = Protéine de surface pneumococcique C

PiaA / PiuA = Acquisition et absorption du fer pneumococcique.

PsaA = Antigène de surface pneumococcique

- La paroi : Le peptidoglycane joue un rôle dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Elle est en outre constituée d'acides téichoïques (17).

### 3.1.6.2 Morphologie

Le pneumocoque est une diplococcus à Gram-positif encapsulé. Les cellules sont de 0,5 à 1,2  $\mu\text{m}$  de diamètre, ovale et disposées par paires (communément appelées diplococci) ou de chaînes courtes. Les cellules plus anciennes se décolorent facilement et colorent en Gram-négative. La morphologie des colonies varie, avec des colonies de souches encapsulées généralement grandes (1 à 3 mm de diamètre sur l'agar de sang, plus petites sur l'agar de sang chocolatée ou chauffée), rondes et mucoïdes, et des colonies de souches non encapsulées plus petites et plus plates. Toutes les colonies subissent une autolyse avec le vieillissement, c'est-à-dire que la colonie se dissout. Les colonies apparaissent  $\alpha$ -hémolytiques sur la gélose au sang, si elles sont incubées de façon aérobie et peuvent être  $\beta$ -hémolytiques (18).

### 3.1.6.3 Caractères culturels

La culture de *S. pneumoniae* nécessite l'adjonction de facteurs de croissance. Les milieux les plus couramment utilisés sont la gélose trypticase soja ou gélose Columbia enrichies à 5% en sang défibriné de mouton ou de cheval. On peut utiliser également la gélose chocolat supplémentée dont la composition est proche de celle du milieu de Mueller-Hinton dans lequel sont incorporés 1% d'hémoglobine et un mélange polyvitaminique remplaçant les facteurs de croissance du sang. L'utilisation d'un milieu sélectif pour isolement des streptocoques : gélose Columbia ANC (acide nalidixique, colistine) permet l'inhibition de la flore bactérienne à Gram négatif contenue dans les produits polymicrobiens. La culture en milieu liquide se fait en bouillon cœur-cerveau ou Todd-Hewitt tamponnés qui favorisent la croissance bactérienne. Comme pour les autres

streptocoques, une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> (5 à 10%) ou une atmosphère anaérobie favorisant la croissance du pneumocoque et l'expression de l'hémolyse. La température optimale de croissance est de 35° à 37°C.

L'ensemencement des produits pathologiques se fait suivant les techniques habituelles de bactériologie. En cas d'orientation à partir des résultats de l'examen direct ou sur la base de renseignements cliniques (pneumopathie systématisée...), il est intéressant de déposer un disque d'optochine (bioMérieux, réf.55912 ; Biorad, réf.53852 ; Eurobio, réf. BIBIDT42-52) directement sur la gélose de primoculture, idéalement placé dans le deuxième quadrant de l'isolement, pour obtenir une première orientation du diagnostic microbiologique après 24 heures d'incubation. L'identification est faite tout d'abord sur l'aspect des colonies. Elles ont un diamètre de 1 à 2 mm, sont opaques ou grisâtres, bombées à bord régulier. Dans la majorité des cas elles ont un aspect S (smooth) plus rarement un aspect R (rough) chez les souches non capsulées et un aspect très muqueux pour les sérotypes 3 et 37 (Geslin et al. 1991). En primo-isolement les colonies ont une forme en dôme qui se creuse sous l'action des autolysines. En raison de cette autolyse, les colonies doivent être repiquées fréquemment pour conserver leur vitalité. Un halo d'hémolyse  $\alpha$  entoure les colonies en atmosphère aérobie. En anaérobie, une hémolyse  $\beta$  peut être observée (libération de la pneumolysine après action des autolysines) (19).

#### **3.1.6.4 Caractères antigéniques**

##### **- La capsule**

La majorité des souches de *S. pneumoniae* possèdent des capsules recouvrant la paroi cellulaire et composées de grands polymères spécifiques de type, qui forment un gel hydrophile à la surface de la bactérie. Les formes rugueuses de *S. pneumoniae* ne possèdent pas de capsule. Les capsules peuvent être observées en microscopie optique, surtout après le passage du germe dans un animal de laboratoire sensible (souris). Jusqu'ici, 84 types de *S. pneumoniae* ont été différenciés grâce à des polysides capsulaires immunologiquement distincts. Les capsules des pneumocoques sont les

premières substances non protéiques dont le rôle antigénique a été montré chez l'homme. La capsule est le facteur principal de virulence des pneumocoques par ses propriétés anti-phagocytaires. Les différents types de *S. pneumoniae* ne possèdent pas les mêmes capacités d'invasion. La virulence dépend de la composition et de la quantité du polysaccharide capsulaire. Les pneumocoques des types 3 et 37 produisent les plus grandes capsules et les colonies de ces deux types sont indistinguables sur des boîtes gélosées au sang. Cependant, les *S. pneumoniae* de type 3 sont parmi les plus invasifs des types pneumococciques alors que ceux de type 37 sont avirulents pour l'homme ainsi que pour les animaux sensibles. La capsule du type 3 est composée de glucose et d'acide glucuronique et celle du type 37 est composée de glucose. Le pneumocoque de type 12 a une petite capsule, mais est très invasif : il est trouvé dans la majorité des cas de pneumonies accompagnées de bactériémies (20).

Les sérotypes capsulaires identifiés diffèrent dans leur composition en polysaccharides et au niveau des liaisons qui les unissent. Le système de nomenclature des sérotypes actuellement utilisé tient compte de la composition en polysaccharides et donc des caractéristiques antigéniques et structurales capsulaires. Les 94 sérotypes sont ainsi classés en 46 sérotypes (1 à 46 avec seuls les sérogroupes 26 et 30 non représentés) associés à une lettre A, B ou C qui est fonction de la spécificité antigénique. Enfin dans un même séro groupe les lettres F (First désignant le premier sérotype d'un séro groupe), L (Lederle ), N (Neufeld ) et V (Valder ) peuvent désigner le sérotype considéré (21).

#### - La paroi cellulaire

On distingue deux couches antigéniques dans la paroi cellulaire, l'une protéique et spécifique de type, l'autre polysaccharidique et spécifique de l'espèce ; ces deux couches sont fortement imbriquées.

La couche protéinique est composée de protéines M et R. La protéine M est spécifique de type. Des souches appartenant au même type capsulaire peuvent avoir des antigènes M différents. La protéine M des pneumocoques ressemble à celle des Streptocoques du

groupe A, car elle est soluble en milieu acide et sensible à la trypsine ; mais elle est sans effet anti-phagocytaire et n'a pas de rôle dans la virulence. Les anticorps anti-M ne sont pas protecteurs. L'antigène protéique R28 est aussi trouvé chez les pneumocoques.

Le polyoside de la paroi de *S. pneumoniae*, dénommé aussi substance C, est spécifique d'espèce ; il est analogue au polyoside des Streptocoques mais antigéniquement différent. Il n'est pas utilisé couramment comme outil d'identification des pneumocoques.

La substance C est un acide teichoïque composé de glucose, de 2-acétamido -2-4-6-tridésoxygalactose, de galactosamine, de ribitol-phosphate et de choline-phosphate. Le déterminant antigénique est le résidu N-acétylgalactosamine-phosphate. La substance C est précipitée par une protéine sérique présente dans le sérum de sujets atteints de pneumococcies ou d'autres affections fébriles (comme la fièvre rhumatismale) ; cette protéine n'est pas un anticorps et est appelée « protéine C-réactive » (20).

### **3.1.6.5 Caractères biochimiques**

Dépourvu d'oxydase et de catalase ;

Deux caractères biochimiques essentiels permettent de différencier *S. pneumoniae* des autres streptocoques  $\alpha$ -hémolytiques ;

Sensibilité à l'optochine ;

Lyse par la bile et les sels biliaires ;

Sensibilité à la vancomycine en anaérobiose avec aspect dentelé et hémolyse  $\beta$  autour du diamètre d'inhibition (22).

### **3.1.6.6 Toxines**

#### **3.1.6.6.1 Pneumolysine**

La pneumolysine est la cytolysine produite par *Streptococcus pneumoniae* et est un facteur clé de virulence.

La pneumolysine active un grand nombre de gènes, certains par modification épigénétique, dans les cellules eucaryotes et de multiples voies de transduction du signal. Les effets

cytolytiques contribuent aux lésions pulmonaires et aux lésions neuronales, tandis que les effets pro-inflammatoires aggravent les lésions tissulaires (23).

#### **3.1.6.6.2 Neuraminidase**

*Streptococcus pneumoniae* produit au moins trois neuraminidases distinctes, dont NanA est la plus active et est conservée dans toutes les souches. La NanA est essentiel pour le pneumocoque dans la colonisation nasopharyngée et le développement de l'otite moyenne et favorise l'invasion des cellules endothéliales cérébrales pneumococciques pour provoquer la méningite. De plus, Parker et al. démontre que NanA pneumococcique est impliqué dans la formation de biofilms, ce qui contribue au processus de colonisation et pourrait augmenter la résistance aux antibiotiques du pneumocoque (24).

#### **3.1.6.6.3 Autolysine**

Les autolysines sont des membres d'un groupe largement distribué d'enzymes qui dégradent le squelette peptidoglycane des organismes bactériens. La principale fonction de ce groupe d'enzymes, la dégradation de la paroi cellulaire, a des conséquences physiologiques importantes, telles que la lyse cellulaire qui conduit directement à la mort cellulaire. Un exemple d'une telle enzyme est la N-acétylmuramoyl-l-alanine amidase de *S. pneumoniae*, également connue sous le nom de LytA amidase (25).

### **3.1.7 Diagnostic bactériologique**

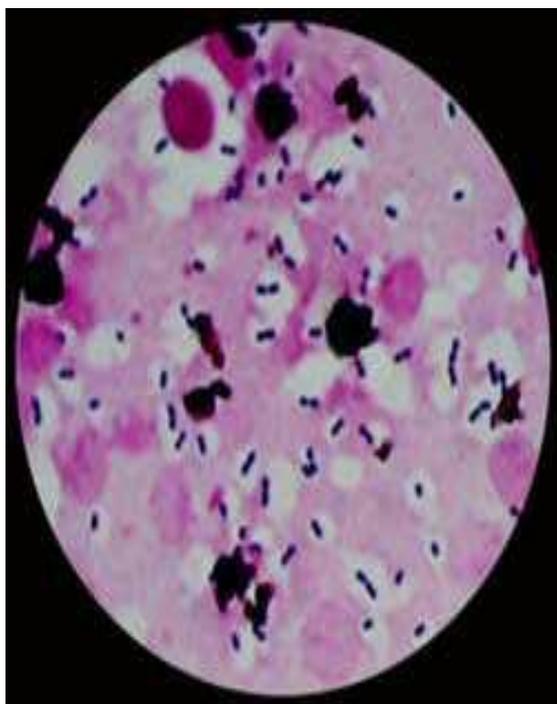
#### **3.1.7.1 Prélèvement et transport**

Le pneumocoque étant une bactérie fragile, les prélèvements doivent arriver rapidement au laboratoire. Toutefois, avec l'emploi de milieux de transport, type Portgerm©, l'acheminement peut être différé (11).

#### **3.1.7.2 Diagnostic direct**

Au Gram, les pneumocoques présentent une morphologie caractéristique, ce sont des cocci à Gram positif, groupés en diplocoques, lancéolés et capsulés en forme de 8 ou présentant un aspect en « flamme de bougie ».

Dans les produits pathologiques tels que LCR, autres liquides de ponction ou prélèvements pulmonaires, la présence de cocci à Gram positif en diplocoques entourés d'un halo intra ou extra-leucocytaires est en faveur d'une infection à pneumocoque. Des aspects atypiques peuvent être observés (Gram douteux, formes pseudo-bacillaires) sur des produits pathologiques après mise sous traitement (26).



**Figure 2 :** Aspect au microscope optique **Figure 3 :** Aspect de *S.pneumoniae* sur PVX

### 3.1.7.3 Identification

Détection antigénique de *S. pneumoniae* dans des échantillons d'urine.

Un test de membrane immunochromatographique s'appuyant sur la détection du polysaccharide associé à la paroi cellulaire qui est commun à tous les sérotypes de *S. pneumoniae* (antigène C-polysaccharide) (Binax maintenant, Binax Inc., Portland, Maine) s'est révélé utile pour l'identification des infections à *S. pneumoniae* chez les patients adultes, en particulier chez les patients qui ont reçu un traitement antibiotique réellement recevable. Par rapport aux méthodes de diagnostic conventionnelles, les sensibilités rapportées à la détection d'antigène dans les échantillons d'urine se situent entre 50 et 80% et les spécificités sont d'environ 90%. En raison du fait que le test est également positif

dans le portage de *S. pneumoniae* sans infection, comme cela est souvent observé chez les nourrissons, il est de valeur limitée pour les patients pédiatriques. Le test ne doit pas être utilisé pour les enfants de moins de 6 ans et des études exhaustives sur les écoliers ayant des taux de colonisation inférieurs n'ont pas été effectuées. Il peut actuellement être recommandé uniquement pour les adultes en complément des techniques de culture diagnostique conventionnelles de *S. pneumoniae* et est probablement très utile pour les patients qui ont reçu un traitement antimicrobien avant l'obtention des cultures (27).

Un test récent, le test NOW<sup>®</sup> *Streptococcus pneumoniae* Binax<sup>TM</sup> par immunochromatographie est maintenant proposé. Rapide, sensible et spécifique, il permet la détection des antigènes solubles dans les urines par reconnaissance du polysaccharide C commun à toutes les souches (Genné et al. 2006). Il est validé dans le diagnostic des pneumonies (Burel et al., 2000) et des méningites (Marcos et al., 2001). Chez l'enfant, son utilisation sur les liquides pleuraux permet d'établir le diagnostic étiologique de nombreuses pleuro-pneumopathies à pneumocoque, surtout lors d'une antibiothérapie préalable (Ploton et al, 2005). Cependant, le portage quasi permanent retrouvé à cet âge peut entraîner des réactions positives avec ce test urinaire surtout s'il est effectué sur des urines concentrées (28).

Dans le laboratoire conventionnel, l'identification de *S. pneumoniae* de culture est réalisée par l'observation précise de son aspect morphologique et de quatre caractéristiques phénotypiques principales, y compris l' $\alpha$ -hémolyse de gélose au sang, la négativité de la catalase, la susceptibilité d'optochine et la solubilité biliaire. La découverte de pneumocoques résistants à l'optochine a diminué l'utilité de cette caractéristique en tant que caractéristique distinctive, mais dans l'ensemble ces marqueurs phénotypiques sont assez fiables (29).

### **3.1.8 Pneumocoques et antibiotiques**

#### **3.1.8.1 Pneumocoques et $\beta$ -Lactamines**

La définition de la résistance

La diminution de sensibilité à la pénicilline G chez le pneumocoque est liée à une modification des protéines liant la pénicilline (PLP) et s'exprime à des niveaux variables selon le nombre et la nature des PLP altérées et le type de modification.

Elle est croisée pour toutes les  $\beta$ -lactamines, avec là aussi une grande hétérogénéité dans son niveau d'expression (30). A l'exception des méningites, les souches sensibles à la pénicilline G ( $CMI \leq 0,0064$  mg/L) et/ou présentant un diamètre  $\geq 20$ mm autour du disque d'oxacilline (1  $\mu$ g) peuvent être rendues sensibles (31).

Concernant les autres  $\beta$ -lactamines, pour le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM), les concentrations critiques sont  $\leq 0,5$  et  $> 2$  mg/L) pour le céfotaxime, la ceftriaxone. Les concentrations critiques des souches sensibles à l'imipénème et au méropénem sont  $\leq 2$  mg/L et  $\leq 0,5$  mg/L pour l'ertapénem. Les souches sensibles catégorisées comme présentant un niveau intermédiaire de résistance doivent être considérées comme résistantes en cas de méningite mais sensibles à de fortes doses en cas d'infection respiratoire. De même, le « Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) » définit des concentrations critiques différentes selon le type d'infection : pour les infections méningées, elles sont  $\leq 0,5$  et  $> 1$  mg/L pour le céfotaxime, la ceftriaxone et le cefpirome et pour les infections non méningées, elles sont  $\leq 1$  et  $\geq 4$  mg/L pour le céfotaxime et la ceftriaxone (30).

#### **3.1.8.2 Pneumocoques et Aminoglycosides**

- . Les streptocoques ;
- . Les pneumocoques ;
- . Les anaérobies sont naturellement résistants aux aminosides (32).

Les streptocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau (BNR) à tous les aminosides. En cas de sensibilité aux aminosides la synergie est possible avec les

pénicillines ou glycopeptides. L'acquisition d'une résistance de haut niveau (HNR) abolit cet effet synergique bactéricide (31).

### **3.1.8.3 Pneumocoques et Macrolides**

*S.pneumoniae* était uniformément sensible aux macrolides jusqu'à la fin des années 1980 aux États-Unis, mais la résistance aux macrolides est maintenant évidente dans 25% des souches de *S. pneumoniae*. Elle est causée par la méthylation méditée par ErmB de l'ARNr 23S, provoquant un phénotype de résistance de haut niveau ou un efflux médité par MefA des macrolides, ce qui entraîne un phénotype de résistance de bas niveau.

Contrairement aux États-Unis, où les deux tiers de la résistance aux macrolides sont médités par MefA, la plus grande prévalence globale de la résistance aux macrolides se retrouve dans certaines parties de l'Europe et la plupart des isolats de *S. pneumoniae* résistants aux macrolides contiennent le gène ermB (27).

La résistance aux macrolides chez *S. pneumoniae* nécessite à la fois mef (E) et mel. Ces gènes sont portés sur l'élément de l'assemblage génétique de macrolide efflux (Mega) et sont exprimés à partir d'un seul promoteur inductible par les macrolides à 14 et 15 membres (par exemple, érythromycine, clarithromycine et azithromycine, Gay et Stephens, 2001, Ambrose et al. , 2005, Chancey et al., 2015b) (33).

### **3.1.8.4 Pneumocoques et Fluoroquinolones**

L'utilisation accrue de fluoroquinolones pour traiter les infections à *S. pneumonie* a été accompagnée d'une augmentation des souches de *S. pneumoniae* résistantes aux fluoroquinolones. La résistance aux fluoroquinolones est due à des mutations dans la topoisomérase IV de l'ADN ou à une mutation de l'ADN gyrase. Alors que la prévalence globale de la résistance aux fluoroquinolones est inférieure à 1% selon les données de surveillance ABC (<http://www.cdc.gov/abcs>), l'augmentation des souches résistantes au cours des dernières années souligne la nécessité d'une surveillance étroite. Les défaillances cliniques du traitement par levofloxacin en raison de la résistance ont été rapportées (27).

### **3.1.8.5 Pneumocoques et Glycopeptides**

Les isolats de *S. pneumoniae* résistants à la vancomycine n'ont pas été décrits (27).

### **3.1.9 Conservation des cultures pures**

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 (34).

L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis (34).

La conservation des souches est possible par lyophilisation, au froid à -80 °C ou en azote liquide à condition de placer les souches dans un milieu conservateur « Pro Lab Microbank Bacterial Preservation System®, Fisher Scientific ». Il est possible de conserver les souches à +4 °C sur gélose au sang non incubée pendant plusieurs jours (28).

## **4. METHODOLOGIE**

## 4 Méthodologie

### 4.1 Cadre de l'étude

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

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

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

Le CICM comprend :

- Une administration générale.
- Un centre de formation avec une formation diplomate le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée) en cours pour un Master de Biologie Médicale appliquée, des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage.
- Un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de diagnostic.

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

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

Les ressources humaines du CICM sont composées de 29 agents, répartis entre les services techniques du LRM (17 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (12 agents).

Le LRM se compose des Laboratoires 1 et 2 au sein desquels les activités de recherche et de diagnostic de routine sont effectuées. Le Laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie et le Laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie).

## **4.2 Type d'étude**

Il s'agit d'une étude d'investigation rétro-prospective.

## **4.3 Période d'étude**

L'étude s'est déroulée sur une période allant de Janvier 2015 à Décembre 2017.

- Période rétrospective : Janvier 2015- Novembre 2016
- Période prospective : Novembre 2016- Décembre 2017.

## **4.4 Population d'étude**

Les souches de *S. pneumoniae* isolées durant la période d'étude ont constitué notre population d'étude.

### **4.4.1 Critères d'inclusion**

Toutes les souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées durant la période d'étude

### **4.4.2 Critère de non inclusion**

Les souches des autres genres bactériens et les souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées en dehors de la période d'étude.

### **4.4.3 Echantillonnage**

Nous avons effectué un échantillonnage exhaustif.

## **4.5 Méthodes**

### **4.5.1 Matériels et réactifs**

#### **4.5.1.1 Examen bactériologiques**

- Microscope,
- Micropipettes
- Pipettes pasteur,
- Plaque chauffante,
- Colorants de Gram,
- Huile à immersion.

#### **4.5.1.2 Isolement**

- Anse de platine
- Bec Benzène
- Jarre d'incubation (aérobie et anaérobie)
- Etuve à 32°C
- Les milieux de culture : Uriselet 4 ; Gélose ANC ; Gélose Sabouraud+Chloramphénicol ou CAN2 ; Gélose Drigalski ; Gélose COS ; Gélose MSA ; Mueller Hinton.

#### **4.5.1.3 Identification**

- Automate (VITEK 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 Compact
- Test d'optochine
- Test de la Catalase
- Test à la bacitracine (voir annexe n°6)

#### **4.5.1.4 Test de sensibilité aux antibiotiques (Antibiogramme)**

Les antibiotiques testés : AMX, AMP, PEN, OXA, ERY, PRI, CIP, PEF, GEN, KAN, TSX, TET, TEI, VAN.

Le vitek 2 compact pour la détermination de la CMI.

La méthode classique sur gélose basée sur la mesure du diamètre d'inhibition des disques d'antibiotiques.

#### **4.5.2 Prélèvements**

Les patients sont d'abord enregistrés sur un support informatique au niveau de la réception.

- Les échantillons apportés (venant d'autres structures) sont directement acheminés au laboratoire où ils sont inscrits dans un registre de paillasse.
- Les prélèvements effectués au laboratoire : Après la réception le patient est orienté dans la salle de prélèvements.

#### **4.5.3 Techniques**

##### **4.5.3.1 Cas de l'hémoculture**

Après la réception, les flacons d'hémocultures sont introduits dans l'automate BacT/ALERT 3D (voir annexe n°2)

Le personnel surveille la croissance bactérienne, via le voyant tactile de l'automate. Au bout de 5 à 7 jours d'incubation, la croissance bactérienne est déclarée positive lorsqu'un signal plus (+) est observé dans le compartiment qui porte le flacon.

Par contre au bout de 7 jours d'incubation s'il y a aucune croissance bactérienne l'automate déclare la culture négative.

- Procédure de technique des hémocultures positives :

Lorsque le Bact /ALERT 3D indique que l'hémoculture est positive :

- Retirer le flacon et désinfecter le bouchon avec de l'alcool.
- Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille qui serve de gouttelettes.

- Ensemencer sur les milieux de cultures : gélose chocolat, COS, gélose Chapman, CAN2, CNA.

#### 4.5.3.2 Cas des pus (voir annexe n°1)

Les renseignements cliniques contribuent au diagnostic bactériologie des pus.

Les milieux de culture : COS, PVX, CAN2, Drigalski, Uriselet 4, MSA.

#### 4.5.3.3 Cas des expectorations (voir annexe n°1)

Les échantillons acheminés au Laboratoire sont techniqués sous une hotte à flux laminaires :

Noter l'aspect macroscopique

Les milieux de cultures : COS, Drigalski, PVX, Uriselet 4, CAN2, MSA.

Les géloses au sang sont incubés jusqu'à 48h.

#### 4.5.3.4 Identification

Après 24h d'incubation, on procède à une identification des colonies suspectées. Si à 24h il y a absence de croissance bactérienne, ré-incuber les géloses au sang pour 48h.

- Isolement des colonies  $\alpha$ -hémolytiques
- La coloration au Gram (voir annexe n°7) oriente l'identification des germes.
- Test de catalase (voir annexe n°4)
- Vitek 2 (voir annexe n°3)
- Test à l'optochine (voir annexe n°5)  
Le disque d'optochine contient l'éthylhydrocupréine qui inhibe la croissance des souches de *Streptococcus pneumoniae*.
- Test à la bacitracine (voir annexe n°6)

#### 4.5.3.5 Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé sur des cultures pures :

- Préparer une suspension dont la densité est comparable au standard (0,5) de Mc Farland
- Vitek 2 compact (voir annexe n°3) donne la CMI des disques d'antibiotiques
- La méthode par diffusion sur milieu gélosé ou la méthode par strie:
  - Ensemencer sur une gélose au sang
  - Déposer les disques d'antibiotiques sur la gélose

- Incuber à 24h

**NB** : Après 24h d'incubation, mesurer les diamètres d'inhibitions des disques d'antibiotiques en se référant à l'EUCAST.

#### **4.5.3.6 Souchothèque** (voir annexe n°8)

Après l'identification, on procède à un souchage des colonies pures de 24h.

- Principe
  - Préparer un bouillon glyciné à 40% (bouillon-cœur-cerveau 60%+ 40% de glycérol)
  - Repartir dans des cryotubes
  - Pendre les colonies pures de 24h et distribuer dans les cryotubes
  - Conserver dans un congélateur à -80°C.

#### **4.5.4 Contrôle de qualité**

Il existe deux(2) types de contrôle de qualité :

- Contrôle interne de qualité basé sur l'évaluation de la performance des réactifs et du matériel au sein du LRM.

- Contrôle de qualité des milieux préparés

Pendre une gélose et garder dans l'étuve pendant 24h à 48h, s'il y a absence de croissance microbiennes le milieu de culture est considéré stérile.

- Contrôle de qualité culturelle des milieux à partir des souches ATCC

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisés des milieux prêts à l'emploi et des milieux préparés au laboratoire

Les milieux ont étéensemencés avec les souches de référence ATCC

Après 24h d'incubation, les colonies sont observées sur les différents milieux.

**NB** : Les géloses au sang sont observés jusqu'à 48h.

Après culture les qualités des différents tests biochimiques (catalase, d'oxydase...) et d'identification sont aussi vérifiés.

- ✓ Le contrôle de qualité des souches de *Streptococcus pneumoniae* est réalisé sur la gélose chocolat (PVX) et les colonies sont de type jaune-verdâtre.

- Contrôle externe de qualité basé sur l'évaluation de la performance inter-laboratoire du LRM

En plus des contrôles de qualité interne le LRM est inscrit dans le réseau du centre Toulousien pour le contrôle de qualité en Biologie clinique (CTCB) pour les évaluations externe de qualité en microbiologie.

NB : Contrôle externe de qualité ou comparaison inter-laboratoire est une obligation de la norme ISO 15189.

#### **4.6 Collecte de données**

Les données sont collectées dans le logiciel SYSLAM CODAT informatique.

#### **4.7 Variables étudiées**

Les variables étudiées sont :

- Sexe
- Saison
- Type de prélèvement
- Résistance aux antibiotiques

#### **4.8 Traitement et Analyses des données**

Les données ont été saisies et analysées sur Epi Info™ 7

Ramener sur Microsoft Excel qui nous a permis d'avoir nos résultats en pourcentage et les figures ont été élaborées sur Microsoft Word.

### **5 Aspects éthiques**

Cette étude de surveillance de la résistance aux antibiotiques a été réalisée en respectant les bonnes pratiques de laboratoire.

Dont l'anonymat était de règle : Pour assurer la confidentialité et éviter la stigmatisation, un numéro anonyme a été attribué à chaque patient. Les ordinateurs ont été protégés par les mots de passe et les questionnaires rendus accessibles seulement à l'enquêteur.

Les participants ne seront pas identifiés dans les publications scientifiques ou dans les présentations liées à cette étude. En aucun cas l'identité des patients ne sera diffusée.

## 6 Diagramme de GANTT

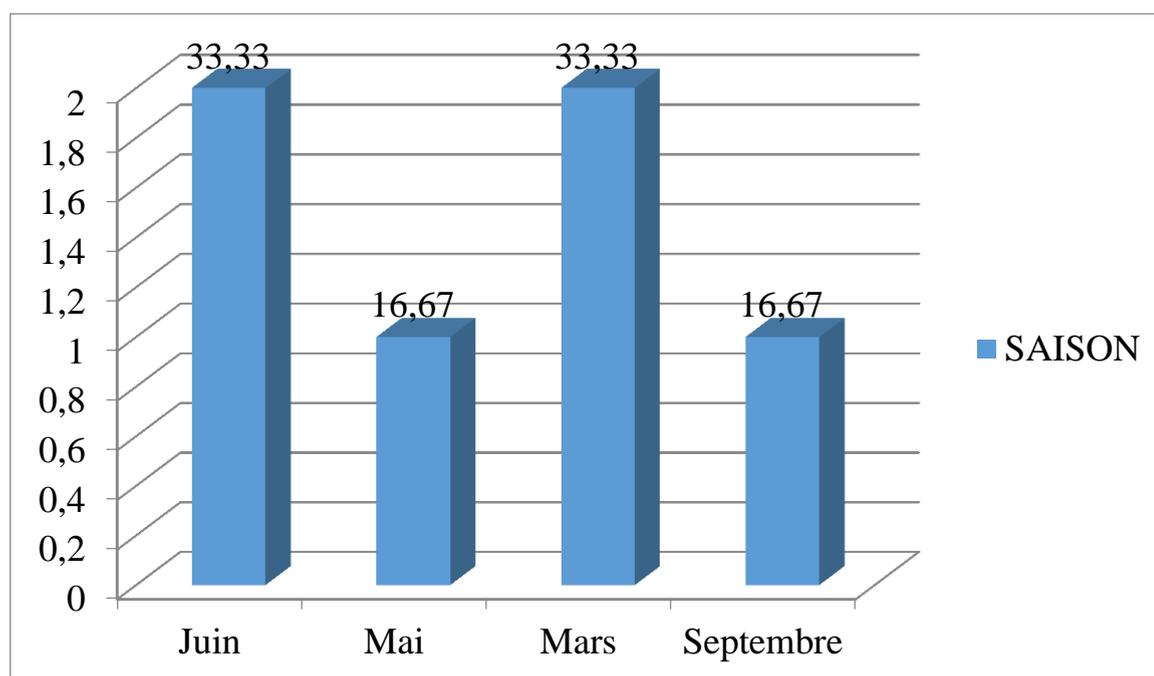
ériode/s tivités	Nov. 2016	Déc. 2016	Janv. 2017	Fév. 2017	Mars 2017	Avr. 2017	Mai 2017	Juin 2017	Juil. 2017	Aout 2017	Sept 2017	Nov. 2017	Oct. 2017	Déc. 2017	Janv. 2018	Fév. 2018	Mars 2018	Avr. 2018	Mai 2018	Juin 2018	
evues térature																					
éthodo ogie																					
énéralit és																					
analyse des onnes																					
orrecti ons																					
utenan ce																					

## **5. RESULTATS**

## 7 Résultats

**Tableau II :** Nombre total d'échantillons reçus au laboratoire de 2015-2017

Types de prélèvements	Effectifs	Année
Hémocultures	567	2015-2017
Pus	706	
Expectorations	38	
<b>Total</b>	<b>1311</b>	



**Figure 4:** Répartition des patients selon le mois de l'année.

*Streptococcus pneumoniae* a été majoré dans les mois de Juin et Mars.

**Tableau III:** Répartition des souches de *S.pneumoniae* isolées par rapport aux types de prélèvements.

Type de prélèvement	Fréquence	Pour cent(%)
"Pus" de Gorge	2	33,33
"Pus" de liquide articulaire	1	16,67
Expectoration	2	33,33
Hémoculture	1	16,67
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>100</b>

La majorité des souches de *Streptococcus pneumoniae* ont été isolées dans les pus et expectorations.

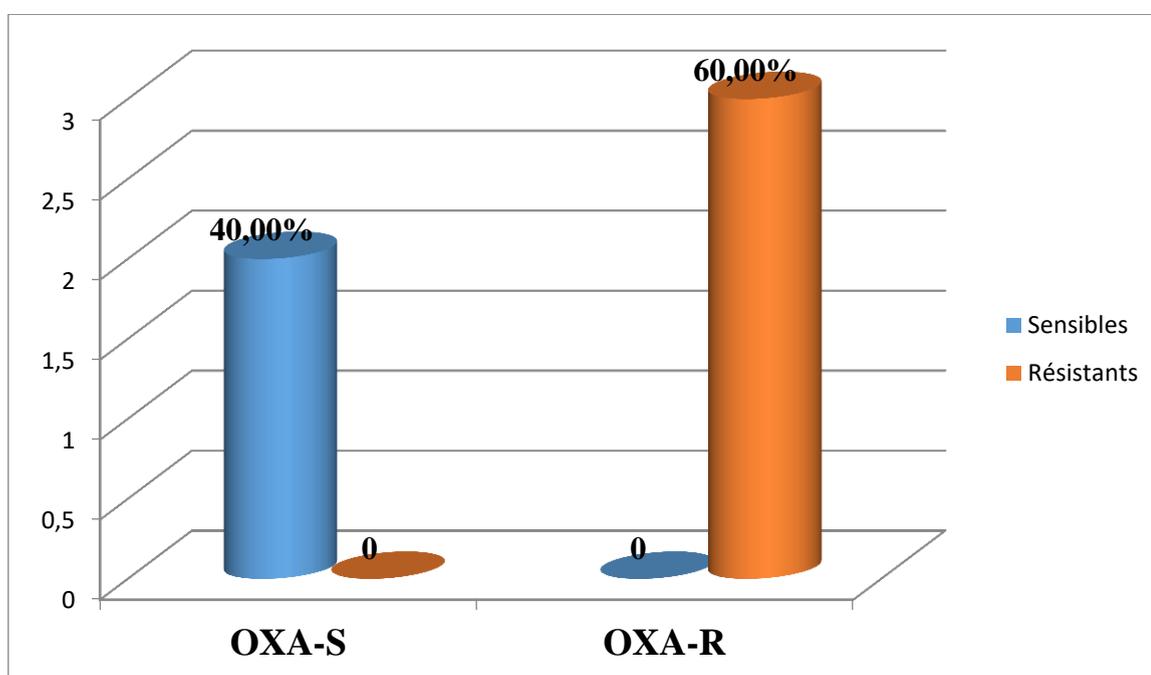
**Tableau IV:** Répartition des patients selon le sexe.

Sexe	Fréquence	Pour cent(%)
Masculin	5	83,33
Féminin	1	16,67
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>100</b>

Le sexe masculin prédomine avec 83,33 contre 16,67 pour le sexe féminin.

**Tableau V:** Profil antibiotique des souches de *Streptococcus pneumoniae* face aux  $\beta$ -Lactamines.

	AMP	AMX	CRO	PEN	OXA
<b>Sensibles</b>	4 (100,00%)	0	2 (100,00%)	4 (66,67%)	2 (40,00%)
<b>Résistants</b>	0	1 (100,00%)	0	2 (33,33%)	3 (60,00%)
<b>Total</b>	4 (100,00%)	1 (100,00%)	2 (100,00%)	6 (100,00%)	5 (100,00%)



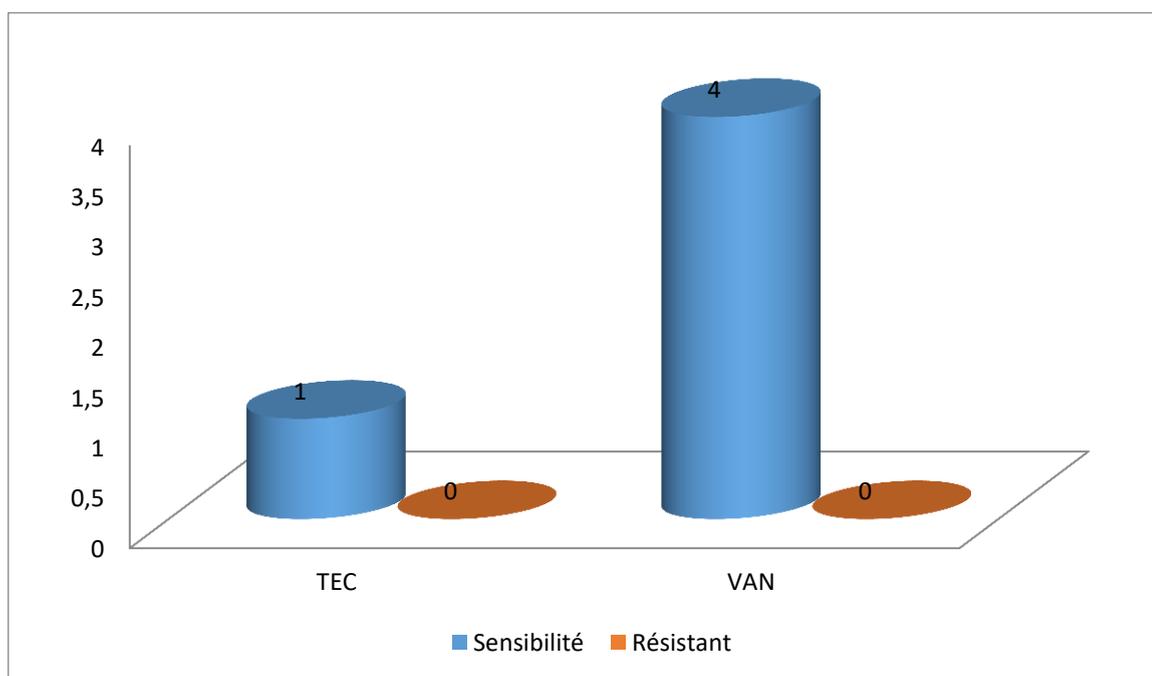
**Figure 5 :** Profil antibiotique des souches de *S. pneumoniae* face aux  $\beta$ -Lactamines.

- 40% OXA-S : Donc souches de pneumocoque sensibles aux  $\beta$ -Lactamines
- 60% OXA-R : Représente les souches de pneumocoque de sensibilité diminuée aux  $\beta$ -Lactamines auxquelles il faut déterminer les CMI en cas de traitement.

**Tableau VI :** Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* par rapport aux Macrolides.

	ERY	PRI
<b>Sensibles</b>	2(33,33%)	2(100,00%)
<b>Résistants</b>	4(66,67%)	0(00,00%)
<b>TOTAL</b>	6(100,00%)	2(100,00%)

La pristinamycine est la molécule la plus active sur les souches de *S.pneumoniae*.



**Figure 6:** Profil antibiotique des souches de *Streptococcus pneumoniae* face aux glycopeptides.

Les glycopeptides sont tous actifs sur les souches de *S. pneumoniae*.

**Tableau VII : Autres**

	<b>GEN</b>	<b>TET</b>	<b>TSU</b>	<b>RFA</b>
<b>Sensibles</b>	1(50,00%)	0	0	<b>1(100,00%)</b>
<b>Résistants</b>	1(50,00%)	<b>2(100,00%)</b>	<b>5(100,00%)</b>	0
<b>Total</b>	<b>2(100,00%)</b>	<b>2(100,00%)</b>	<b>5(100,00%)</b>	<b>1(100,00%)</b>

Les aminosides ont été testés pour des contrôles de routine.

## **6. DISCUSSIONS**

## 8 Discussions

Au terme de notre étude, nous sommes confrontés à des difficultés :

- La demande en échantillons d'expectorations était faible.

L'étude rétro-prospective de diagnostic des examens bactériologiques de laboratoire a concernée les prélèvements dans lesquels ont été mis en évidence la présence de *Streptococcus pneumoniae*.

Ces prélèvements étaient constitués des hémocultures, des pus, des expectorations et autres liquides biologiques.

L'identification des souches de *Streptococcus pneumoniae* a été réalisée à partir du Vitek 2 compact.

Au terme de notre étude, un total de **1311** échantillons ont été analysés qui se répartissent comme suit :

- Pus sur un total de **706** trois(3) souches isolées ;
- Hémocultures un cas isolées sur un total de **567** flacons incubés ;
- Expectoration nous avons isolés deux souches sur un effectif de **38**.

L'étude de **R. Mariko** (35) rapportait une prédominance des souches de *Streptococcus pneumoniae* dans les hémocultures, soit 32,87% des pathogènes isolés sur un effectif de 356 souches bactériennes au CHU Gabriel Touré en 2005.

Dans notre étude le sexe masculin prédominait avec **83.33%** contre **16.67%** pour le sexe féminin. Ce pourcentage en faveurs des hommes qui peut être dû à la taille de l'échantillon.

Le profil de résistances aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae* est déterminé à partir de deux techniques complémentaires :

- Vitek 2 compact
- Et la méthode classique basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions des disques d'antibiotiques en référant a l'abaque de l'EUCAST.

Le Mali est loin d'être à l'abri du phénomène de résistance des souches *S. pneumoniae* à la famille des  $\beta$ -Lactamines.

Une diminution de sensibilité aux  $\beta$ -Lactamines doit être recherchée à l'aide d'un disque d'oxacilline chargé à 1 $\mu$ g (31), au cours de notre étude nous observons que l'oxacilline a été résistante à 60% contre une sensibilité de 90,90% obtenue par M. Diallo au CHU Gabriel Touré en 2014(36).

En Europe la non-susceptibilité à la pénicilline a fluctué entre 12% et 16% sans tendance majeure dans le temps une étude rapportée par F. Blanquart et al..(37).

Il ressort de notre étude de la sensibilité aux antibiotiques, l'érythromycine faisant partie des antibiotiques couramment utilisés au Mali, nous avons obtenu une résistance de 66,67% contre une sensibilité de 93% rapporté par T. Haïdara en 2002 à l'hôpital.

Malgré les craintes des souches multirésistantes de *Streptococcus pneumoniae*, le pneumocoque reste toujours sensible aux glycopeptides ; la vancomycine a été active à 100%, résultat confirmé par l'étude de Y. Naima et O. Samia au CHU Khellil Amrane de Béjaïa en Algérie en 2017 (38).

## **7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS**

## 9 Conclusion et Recommandations

### 9.1 Conclusion

Cette étude rétro-prospective allant de Janvier 2015 à Décembre 2017, sur un échantillon de 1311 nous a permis d'évaluer la fréquence d'isolement de *Streptococcus pneumoniae* au C.I.C.M.

Au terme de notre étude, nous pouvons conclure que la pristinamycine et les glycopeptides restent les molécules les plus actives sur *Streptococcus pneumoniae*.

### 9.2 Recommandations

❖ Aux Directeur du C.I.C.M

Renforcer la politique de surveillance des souches multirésistantes isolées.

Entretenir le système de contrôle qualité.

❖ Au Ministre de la santé

D'adopter une politique nationale de prestations des antimicrobiens dans les centres de santé.

Renforcer les laboratoires de recherche, en les dotant par des équipements de haut niveau.

❖ A l'endroit des pharmaciens d'officines

Eviter la dispensation des antibiotiques sans ordonnance

❖ A l'endroit de la population

Eviter l'automédication autrement dit la consommation abusive des antibiotiques.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références

1. Jauneikaite E, Tocheva R, Jefferies J, Gladstone R, Faust S, Christodoulides M, et al. Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. Juin 2015; Disponible sur: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819558](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819558)
2. Yang wang, Jingxin L, Yuxiao, Wans, Wei,Gu, Fengcai Z. Effectiveness and practical uses of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in healthy and special populations. 18 nov 2017; Disponible sur: [www\\_ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/pubmed/29261406](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29261406)
3. Bénet T, Sylla M, Diallo S, Diakite A-A, Picot VS, Messaoudi M. Etiology and Factors Associated with Pneumonia in Children under 5 Years of Age in Mali: A Prospective Case-Control Study. 22 déc 2015; Disponible sur: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145447>
4. Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, San Jose A, Torres A. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. déc 2016; Disponible sur: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999274](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27999274)
5. Uri O, José L, Craig T, Robin T, Andrea G, Sunetra G. Vaccination can drive an increase in frequencies of antibiotic resistance among nonvaccine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. 13 févr 2018; Disponible sur: <https://doi.org/10.1073/pnas.1718712115>
6. Messaoudi M, Milenkov M, Albrich WC, Linden MPG van der, Bénet T, Chou, M, et al. The relevance of a novel quantitative assay to detect up to 40 major *Streptococcus pneumoniae* serotypes directly in clinical nasopharyngeal and blood specimens. 2016; Disponible sur: [www\\_ncbi\\_nlm\\_nih\\_gov/pmc/articles/PMC4795784/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4795784/)
7. Picot VS, Thomas Bénet, Messaoudi M, Jean-Noel Telles, Sylla M, Diallo S, et al. Multicenter case-control study protocol of pneumonia etiology in children: Global Approach to Biological Research, Infectious diseases and Epidemics in Low-income countries (GABRIEL network). 10 déc 2014; Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/635>
8. Campbell J, Sow S O, Levine M M, Kotloff KL. The causes of hospital admission and death among children in Bamako, Mali. Juin 2004; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15233192>
9. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3e édition. Paris: Ellipses Edition Marketing S.A; 2000.
10. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 1 avr 2008;6:288.

11. Fauchère J-L, Avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Paris: Ellipses Edition Marketing S.A; 2002. 218-228 p.
12. Flandrois J-P. *Streptococcus pneumoniae* (Pneumocoque). 2015; Disponible sur: JP.Flandrois bactériologie Médicale.coll Azay.puf.2000 [http://larousse.fr/enclopedie/medical/Streptococcus pneumoniae/16291](http://larousse.fr/enclopedie/medical/Streptococcus_pneumoniae/16291)
13. Baggett H.C, Watson NL, Knoll M.D, Levine O S, Sow S O., Scott JAG. Density of upper respiratory colonization with *Streptococcus pneumoniae* and its role in the diagnosis of Pneumococcal Pneumonia Among Children aged <5 years in the PERCH Study. 2017; Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/317371981>
14. Charles Feldman, Ronald Anderson. Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus[ version 1; referees: 2 approved]. 14 sept 2016;
15. Sandrine Boisset. Epidémiologie du pneumocoque. MCU-PH Bactériologie DU Thérapeutiques anti-infectieuses 2015 janv 16. Disponible sur:Google.fr
16. Dodi S, Ger R, Harm S. The future of synthetic carbohydrate immunological studies on *Streptococcus pneumoniae* Type 14. 31 oct 2012; Disponible sur: <http://dx.doi.org/10.5772/48326>
17. Xue L, Clement G, Jan-willem V. High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. Juillet 2017;
18. Murray P.R, Rosenthal K.S, Pfaller M.A. Medical microbiology. 8e édition. U.S.A: Elsevier; 2016. 195-199 p.
19. Thierry J, Perrier-Gros-Claude J-D, Masseron T, Ros A. *Streptococcus pneumoniae*. In: Précis de bactériologie clinique. 2e édition. Editions ESKA; 2007. p. 899-907.
20. Le Minor L, Veron M. Bactériologie médicale. 2è édition. Flammarion médecine-sciences; 1990. 817-820 p.
21. Terrasse R. La glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une protéine de la glycolyse présente à la surface cellulaire, est impliquée dans la reconnaissance par le système du complément chez *Streptococcus pneumoniae* [Internet]. [Grenoble]; 2013. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01118661>
22. Saidani M. *Streptococcus pneumoniae*. 2010; Disponible sur: <http://www.infectiologie.org.tn>
23. Helen M., Marriott, Mitchell J.T, David H. Dockrell. Pneumolysin: A Double-Edged Sword During the Host-Pathogen Interaction. 2008; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781957>
24. Song M, Teng Z, Li M, Niu X, Wang J, Deng X. Epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus pneumoniae* virulence by simultaneously targeting pneumolysin and sortase A. oct 2017; Disponible sur: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402019](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402019)

25. Mark J. Jędrzejak. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. juin 2001; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99024/>
26. Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale. Elsevier Masson; 2007. 278-281 p.
27. Spellerberg B, Brandt C. *Streptococcus*. In: Manual of clinical microbiology. 9ème. USA; 2007. p. 412-27.
28. Thierry J, J-D. Perrier-Gros-Claude, Masseron T, Ros A. Précis de Bactériologie Clinique. 2 édition. Paris; 2007.
29. Anne J. Blaschke. Interpreting Assays for the Detection of *Streptococcus pneumoniae*. Mai 2011; Disponible sur: <http://login.research4life.org/tacsgr1www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3069982/>
30. Bingen E. B-lactamases et streptocoques (pneumocoques). In: AntibioGramme. 3e édition. Paris: Editions ESKA; 2012.
31. Ricard B, Christian C, Patrice C, Marie-Hélène N-C, Marie-Cécile P, Emmanuelle V. EUCAST comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie [Internet]. Paris; 2017. Disponible sur: [www.sfm.microbiologie.org](http://www.sfm.microbiologie.org)
32. Adnene T. Les Aminocyclitolides [Internet]. 2008 nov 28; Service des maladies infectieuses CHU Fattouma Bourguiba-Monastir. Disponible sur: Google .fr
33. Schroeder M R, Stephens D.S. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Sept 2016; Disponible sur: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709102](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27709102)
34. Henri L. Microbiologie générale. 2ème Edition. 1983. 199-202 p.
35. Mariko R. Caractères bactériologiques et place de *STREPTOCOCCUS pneumoniae* dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'Hôpital Gabriel Touré. [FMPOS de Bamako au Mali]; 2005.
36. Diallo M.A. Prévalence des bactéries isolées dans les hémocultures et des expectorations induites chez les enfants admis pour cause pneumonie au CHU Gabriel Touré. [Faculté de pharmacie de Bamako]; 2014.
37. Blanquart F, Lehtinen S, Fraser C. An evolutionary model to predict the frequency of antibiotic resistance under seasonal antibiotic use, and an application to *Streptococcus pneumoniae*. 2 mai 2017; Disponible sur: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/>
38. Yahaoui N, Ourari S. La résistance aux antibiotiques dans les infections respiratoires basses bactériennes en milieu hospitalier cas du CHU Khedil Amrane de Béjaia. Université A. Mira- Bejaia; 2017.

## Fiche signalétique

**Nom : Kamaté**

**Prénom : Hamidou**

**Adresse : [kamatehamidou13@gmail.com](mailto:kamatehamidou13@gmail.com)**

**Nationalité : Malienne**

**Titre : Contribution à la surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de *Streptococcus pneumoniae* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2015 à 2017 à Bamako au Mali.**

**Année académique : 2017-2018**

**Ville de soutenance : Bamako**

**Pays : Mali**

**Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de médecine et d'odonto-stomatologie et de la faculté de pharmacie.**

### Résumé

*Streptococcus pneumoniae* est une bactérie commensale des voies respiratoires supérieures souvent à l'origine d'infections otorhinolaryngologiques surtout chez l'enfant (otites moyennes aiguës, sinusites aiguës), de pneumopathies communautaires et de méningites purulentes.

L'étude avait pour objectif de contribuer à la surveillance de la résistance aux antibiotiques des souches de *Streptococcus pneumoniae*.

L'étude rétro-prospective réalisée au C.I.C.M allant de Janvier 2015 à Décembre 2017, concerne les prélèvements qui ont mis en évidence la présence de *Streptococcus pneumoniae*.

- Dans les hémocultures nous avons isolés **un** cas sur un total de **567** flacons incubés.
- Dans les pus sur un total de **706**, trois (**3**) souches isolées.
- Deux (**2**) souches isolées dans les expectorations sur un total de **38**.

La sensibilité aux antibiotiques est déterminée avec le Vitek 2 compact et la méthode par diffusion sur milieu gélosé basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions des disques antibiotiques.

La pristinamycine et les glycopeptides restent les molécules les plus actives aux *Streptococcus pneumoniae*.

Mots clés : *Streptococcus pneumoniae*, résistance aux antibiotiques,  
Mérieux au Mali

## Identification SHEET

**Family name : KAMATE**

**First name : Hamidou**

**Title:** Contribution to the surveillance of antimicrobial resistance of strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated at the Rodolphe Mérieux Laboratory from 2015 to 2017 in Bamako, Mali.

Academic year: 2017-2018

City of defense: Bamako

Country: Mali

Place of deposit: Library of the Faculty of Medicine and Odonto-Stomatology and Faculty of Pharmacy.

### Summary:

*Streptococcus pneumoniae* is a commensal bacterium of the upper respiratory tract that often causes otorhinolaryngological infections, especially in children (acute otitis media, acute sinusitis), community-acquired pneumonia, and purulent meningitis.

The objective of the study was to contribute to the surveillance of antibiotic resistance of strains of *Streptococcus pneumoniae*.

The retrospective study carried out at C.I.C.M from January 2015 to December 2017, concerns samples that have revealed the presence of *Streptococcus pneumoniae*.

- In blood cultures we isolated one case out of a total of 567 incubated flasks.
- In pus out of a total of 706, three (3) strains isolated.
- Two (2) strains isolated in sputum out of a total of 38.

Antibiotic sensitivity is determined with the Vitek 2 compact and the agar diffusion method based on the measurement of inhibitory diameters of antibiotic discs.

*Streptococcus pneumoniae* was sensitive to Pristinamycin (100%) and glycopeptides.

**Key words:** *Streptococcus pneumoniae*, antibiotic resistance, Mérieux in Mali.

# **ANNEXES : MODE OPERATOIRE**



## 10 Annexes: Mode opératoire

### 10.1 Annexe n°1: MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN

#### BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

Rédigé le:	21/02/2013	Par : Doussou	DC	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/2013	Par : Dr Bréhima	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Abderrhamane	AM	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en application	25/04/2016	Par :		Version N° 1
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

**X Document opérationnel**

**Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité**

**- Dossier commun sur le serveur**

**Documents Qualité liés:**

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P: Procédure de gestion des déchets**

**MO: Mode opératoire de la coloration de Gram**

**Mode opératoire d'utilisation du VITEK 2 COMPACT**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api**

**D:**

**E:**

**I – Buts**

Décrire le mode de l'examen bactériologique des pus et abcès.

**II - Domaines et personnels concernés**

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

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen Cytobactériologique

ATB : AntibioGramme

#### **IV – Références**

#### **V – Contenu**

### **MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES**

## **1 Principe**

Il s'agit d'identifier des germes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

## **2 Matériel**

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes
- Pipettes pasteur,
- Jarre (aérobie et anaérobie),
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automate (mini Api - VITEK 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 Compact

## **3 Consommables**

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,
- Tubes à hémolyse,
- Oeses,

- Cartes VITEK 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies.

## 4 Réactifs

- Milieux de culture,
  - Bouillon,
  - Colorants de Gram,
  - Réactif de la catalase,
  - Réactif du test de l'oxydase,
- Réactif du test de coagulase
- Réactif Urée-Indole-TDA.

### 4.1 Etape pré analytique

#### 4.1.1.1 Nature du prélèvement

La nature du prélèvement doit être inscrite en renseignement clinique sur la fiche d'analyse qui accompagne le prélèvement. Le prélèvement doit être collecté soit dans un tube sec, soit par écouvillonnage et acheminé immédiatement au laboratoire, à défaut le conserver au frais pour le lendemain.

#### 4.1.1.2 Localisation

- Editer fiche de paillasse sur le Syslam (Système Informatique de Gestion du Laboratoire) en tapant **66** après avoir saisi le nom et le mot de passe de l'utilisateur qui est individuel.
- Choisir une **imprimante** (2 ou 4) au niveau de la réception, puis **lancement** et terminer par **sortir**.

Sur la fiche récupérée, notifier le type de prélèvement dans la liste **DA** à savoir :

cutané	oreille	narine	plaie	cathéter
lait maternel	oreille gauche	narine gauche	ulcère	escarre
squames	œil droit	lingual	péri anal	sécrétion
ongle	œil gauche	gingival	gland	
nasal	buccal	gorge	pus	

-Préciser si le prélèvement est soit effectué au laboratoire, soit transmis ou soit apporté dans la liste **DC**. Les listes **DE, DG, DI, DJA, DJB** sont à ignorer.

## 4.1.2 Etape analytique

### 4.1.2.1 Protocole de l'analyse

#### 4.1.2.1.1 Préparation de la suspension

- Porter les milieux de culture (Gélose au sang – Drygalski – Chapman-Sabouraud – Mueller Hinton) à l'étuve pour séchage cinq (05) minutes environ,
- Préparer si possible une suspension à l'aide de Api Medium (si prélèvement par écouvillonnage),
- Identifier un tube à hémolyse contenant un bouillon de cœur-cervelle et y ajouter deux à trois gouttes de la suspension réalisée si la plaie est profonde,
- Si le prélèvement est dans un tube utiliser directement le prélèvement.

#### 4.1.2.1.2 Examen direct

- Sur une lame, réaliser un étalement du prélèvement
- Sécher la lame sur la plaque chauffante préalablement régler à 50 °C,
- Passer à la coloration Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram.**

**Réf. M07 ANA BAC- 021 V1**

**N.B.** Attention ne pas dépasser cette température au risque de déformer les germes.

#### 4.1.2.1.3 Culture

- Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu :
  - Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>,
  - Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>,
  - Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,
  - Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
  - Chapman, incubé en aérobiose,
  - Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
  - CAN 2, incubé en aérobiose,
  - Mueller Hinton, incubé en aérobiose,
  - Bouillon cœur cervelle.

- Porter le tout à l'étuve pendant 24 heures.

**NB** : si les germes ne poussent pas sur les différents milieux de culture cités ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

#### 4.1.2.1.4 Lecture et interprétation

- Identifier et faire les antibiogrammes sur les colonies suspectes
- Si la culture est stérile après 24 heures d'incubation, ré-incuber les géloses au sang sous CO<sub>2</sub> pendant 48 heures,  
En présence d'un **Bacille Gram négatif** :
  - Lactose positive, faire l'identification et l'antibiogramme
  - Lactose négative, faire le test à l'oxydase puis réaliser simultanément une identification et un antibiogramme en fonction du résultat du test,
- En présence d'une **cocci Gram positif**, catalase négative type Streptocoque, faire le Slidex Strepto-plus et étudier en fonction du contexte clinique (par exemple : la détermination du Streptococcus pneumo par le test d'optochine, Cf. mode opératoire du test à l'optochine),
- En présence d'une **cocci Gram positif**, catalase positive, mannitol positif, faire la coagulase puis passer à l'antibiogramme en cas de positivité,
- Si la coagulase est négative discuter avec le biologiste ou ses assistants et étudier toujours en fonction du contexte clinique,
- En **présence des levures**, identifier et faire l'antifongogramme,
- Pour d'autres morphologies, discutées avec le biologiste ou ses assistants.  
Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture : Pour d'éventuel cas de souchage (Bacilles Multi résistants, Staphylocoques Méthicyline résistants et Vancomycine résistants...).

#### 4.1.2.1.5 Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir des disques sur milieu Mueller Hinton ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Edition de Janvier 2007).

- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr des résultats donnés par l'appareil.
- Si l'antibiogramme est réalisé sur le VITEK 2 Compact, un système d'expertise incorporé à la base de données permet une interprétation plus détaillée des types de résistances. Devant une suspicion de présence d'une Bêta lactamase à spectre élargie (BLSE) faire la recherche sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.

#### **4.1.2.2 Validation technique/ Critères de repasse**

Ceux-ci sont réservés au technicien qui apprécie la pureté des colonies à travers les galeries API et celles des ATB. Si un contaminant est observé, purifier de nouveau à partir de la pureté pour une bonne identification et un bon antibiogramme.

#### **4.1.2.3 Hygiène et sécurité**

Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel à 10 %

- Toujours manipuler en présence d'une flamme
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminations
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter de déposer les bouteilles au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de javel et au savon anti-bactéricide.

### **4.1.3 Etape post analytique**

#### **4.1.3.1 Validation biologique**

Réservé au biologiste ou ses assistants. Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur. Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

#### **4.1.3.2 Rendu des résultats**

Préalablement noté sur la fiche de paillasse éditée sur le système informatique CODAT, saisir les résultats. Si possible téléphoner le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste ou ses assistants sont à mesure de téléphoner.

#### **4.1.3.3 Gestion des déchets**

Vider à chaque fin de journée les boites de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotchées et déportées à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux. Réf. P10 HYG- 002 V1.**

#### **4.1.3.4 Archivage des données**

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives. Le système informatique du laboratoire archive aussi tous les dossiers des patients.

## 4.2 Annexe n°2: MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

Rédigé le:	30/06/201	Par : Abderrhamane MAIGA	AM	Visa :
Vérifié le:	30/06/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	04/07/201	Par : Pr Souleymane	SD	Visa :
Modifié le:	21/02/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Vérifié le :	23/02/201	Par : Abderrhamane MAIGA	AM	Visa :
Approuvé le:	10/03/201	Par : Dr Madine TALL	MTT	Visa :
Mise en application	10/04/201			Version N° 3
Date de revue :	21/02/201			
Objet de la modification:	Ajout ensemencement gélose au chocolat si Cocci à GRAM positif type			
Archivé le :				

Document provisoire



**X Document opérationnel**

**Exemplaires :** - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

**Documents Qualité liés:**

**MAQ: Manuel Qualité LRM**

**P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG-002 V1**

**MO: Mode opératoire d'utilisation du BacT/ALERT 3D Réf. M07 ANA BAC- 017 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1**

**Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**

**Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1**

**D:**

**E:**

### **I. Buts**

Décrire les techniques de mise en évidence de la présence ou non des micro-organismes dans le sang dans le cadre de l'étude de la fièvre et des infections chez l'enfant drépanocytaire au Mali.

## **II. Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

## **III. Abréviations/Définitions**

## **IV. Références**

## **V. Contenu**

### **1. Principe**

Identifier des micro-organismes pathogènes par ensemencement sur un certains nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

### **2. Matériel**

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes,
- Pipettes pasteur,
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automates (mini API - VITEK 2 COMPACT),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 COMPACT,
- BacT / ALERT 3D,
- Gants,
- Embouts stériles,
- Lames porte objets,
- Poubelle pour déchets usagés.

### **3. Consommable**

- Gants,
- Embouts,
- Lame et lamelle,
- Anse,

- Cartes VITEK 2 COMPACT,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies,
- Flacons aérobie et anaérobie, flacon pédiatrique pour le BacT / ALERT 3D.

#### **4. Réactif**

- Milieux de culture : gélose chocolat, COS, Chapman, CAN2, CNA etc.
- Colorants de GRAM,
- Solutions de révélation

#### **5. Pré analytique**

##### **5.1. Condition du prélèvement**

Les prélèvements sont réalisés sous la responsabilité du biologiste et pratiqués par le personnel autorisé.

##### **5.2. Matériels**

- Deux solutions antiseptiques : alcool à 90°C, Bétadine dermique à 30%.
- Coton hydrophile : un coton imbibé d'alcool, un coton imbibé de Bétadine.
- Seringue de 10cc
- Une épicrotine
- Un garrot
- Boite de récupération des aiguilles usagées
- Poubelles pour déchets biologiques.
- Il est important de noter qu'il existe des critères d'inclusion des patients à l'hémoculture. Au centre de développement pour les vaccins du centre hospitalier universitaire Gabriel Touré se sont:
  - Température non corrigée supérieure ou égale à 39°Celsius
  - Suspicion d'infections bactériennes invasives : méningite, pleurésie, fièvre typhoïde, arthrite septique, péritonite...
  - Le préleveur s'assure de l'identité du patient (nom, prénom, âge) ; préparer le matériel nécessaire.
  - Il pose le garrot, s'assure de l'asepsie en nettoyant le pli du bras à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, et enfin un coton imbibé de Bétadine.

- En fonction de l'âge, prélever 1 ml chez le nouveau né, 2 ml enfant de 1-4 mois, 3 ml enfant de plus de 4 mois.

**NB** : Les flacons d'hémoculture doivent être bien mélangés et immédiatement acheminés au laboratoire après prélèvement. On retrouve au fond de chaque flacon des détecteurs de CO<sub>2</sub>, dont le signal sera synonyme de présence de germes pathogènes dans la culture.

## 6. Analytique

Enregistrer les flacons dans le registre prévu pour la circonstance se trouvant dans le laboratoire de Microbiologie.

### 6.1. Introduction des flacons dans le BacT/ALERT 3D.

- A partir de l'écran principal appuyé sur l'icône bleue,
- Scanner le code barre du flacon à l'aide de la douchette située sous l'écran de contrôle, ou le noter à l'aide du clavier se trouvant sous la douchette,
- Introduire dans le tiroir du jour et dans l'alvéole de son choix (la position n'est pas déterminée par l'automate)
- Fermer le tiroir et valider les saisies en appuyant sur V.

**Remarque** : Si la mise en place des flacons est supérieure à 2 minutes, une alarme s'active en colorant l'écran en rouge et en mettant le code erreur 20.

Dans ce cas, fermer le tiroir, toucher l'écran et l'alarme s'arrête. Renouveler la procédure d'introduction depuis le début pour introduire les flacons restants.

### 6.2. Que faire lorsqu'un flacon est déclaré soit positif, soit négatif ?

L'écran devient jaune et un chiffre apparaît sur la colonne notée BC.

#### **Pour sortir le flacon positif du BacT/ALERT 3D**

- Appuyer sur l'icône +
- Un voyant s'allume sur le tiroir où se trouve le flacon positif
- Ouvrir le tiroir, l'alvéole concernée clignote
- Sortir le flacon sans le scanner et refermer le tiroir et valider en appuyant sur

#### **V. Pour sortir le flacon négatif du BacT/ALERT 3D**

- Appuyer sur l'icône –

- Un voyant s'allume sur le ou les tiroirs concernés
- Ouvrir le tiroir et sortir les flacons dont le voyant est vert un à un (à chaque retrait, le voyant vert se met à clignoter)
- Refermer le tiroir et appuyer sur V.

### 6.3. Traitement des flacons

- Les flacons sortis négatif ne feront pas l'objet d'étude et le résultat sera saisi « stérile » tout en mentionnant la date de sortie.
- Les flacons sortis positif
- Désinfecter la partie caoutchouc du flacon avec de l'alcool iodé
- Mélanger voir vortexer le flacon
- Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille associée à une seringue de 10 ml
- Si le bouchon du flacon (en particulier pour le flacon anaérobie) est bombé, évoquant la présence de gaz dans le flacon, retirer le piston, laisser le gaz s'échapper via l'aiguille, puis passer à l'ensemencement.
- Examen direct et mise en culture
- Sur une lame porter le numéro d'identification du patient, recouvrir d'une lamelle une à deux gouttes du bouillon bien mélangé et observer au microscope des éventuels germes mobiles.
- Après observation retirer la lamelle, laisser sécher sur la paillasse et procéder à la coloration de GRAM et lire aussitôt.

#### **Cf. Mode opératoire de la coloration de GRAM Réf. M07 ANA BAC- 022 V2**

**N.B :** La coloration de GRAM permet au Biologiste ou à ses assistants d'informer le site clinique Pneumobama à la pédiatrie du résultat obtenu. Selon la morphologie lue, ensemenecer :

- Si **bacille à GRAM négatif**, ensemenecer une goutte du bouillon sur milieu Drigalski et sur une gélose au sang frais (COS) à incuber sous CO<sub>2</sub>,
- Si **cocci à GRAM positif type Staphylocoque**(en grappe de raisin), ensemenecer une goutte du bouillon sur milieu Chapman, sur une gélose au sang frais et au chocolat à incuber sous CO<sub>2</sub>,

- Si **cocci à GRAM positif type Streptocoque** (en chaînette), ensemencer une goutte du bouillon sur milieu gélose au sang frais (COS) incubée sous CO<sub>2</sub> ;
- Si présence **de levures** ensemencer un Sabouraud ou un CAN2.  
Pour le flacon anaérobie, quel qu'en soit le GRAM lu ensemencer une gélose au sang frais et incubé en anaérobiose par le biais de sachet ana (genebag)

#### 6.4. Lecture et interprétation

- Bacille à GRAM négatif type entérobactérie oxydase négative, identification galerie API 20 E ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme,
- Bacille à GRAM négatif type non entérobactérie oxydase positive, identification galerie API20 NE ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme  
**Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**
- Cocci à GRAM positif type Streptocoque, identification galerie API 32 Streptocoques ou carte Vitek GP tout en ensemencant une gélose au sang cuit à partir de la suspension bactérienne en posant un disque d'optochine **Cf. Mode opératoire du test à l'optochine Réf. M07 ANA BAC- 031 V2**
- Cocci à GRAM positif type Staphylocoque :  
Si catalase positive, Slidex négatif et mannitol négatif Staphylocoque coagulase négative à discuter avec le Biologiste ou ses assistants,  
Si catalase positive, Slidex positif et mannitol positif, identification galerie API Staphylocoques ou carte Vitek suivi de l'antibiogramme. **Cf. Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07ANA BAC- 023 V1**
- Autre morphologie, à discuter avec le biologiste ou ses assistants.
- Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture en fonction du germe.

#### 6.5. Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir de disques sur milieu M.H ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur la fiche des diverses CMI prévues pour la circonstance.

- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr sur la sensibilité – intermédiaire – résistance donné par l'appareil.
- Si cas d'une **Bêta lactamine à spectre élargie** faire la recherche de BLSE sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne
- Réalisé sur le VITEK 2 COMPACT une éventuelle interprétation devient difficile en ce sens que tout se passe dans la machine et que les cartes ne sont pas faciles à interpréter. L'essentiel est de ne pas confondre le GRAM (positif et négatif).

### 6.6. Validation technique / Critères de repasse

Réservé au Technicien qui apprécie la pureté de ces colonies à travers les galeries API et celles des ATB.

Si un contaminant est observé ré purifier à partir de la pureté pour une bonne identification et antibiogramme.

### 6.7. Résultat

Les résultats sont validés automatiquement par le technicien grâce à une connexion bidirectionnelle. Si cette connexion est dérangée, les résultats peuvent être saisis manuellement sur le système CODAT.

Les résultats de l'étude Pneumobama sont enregistrés dans les documents y afférant.

### 6.8. Hygiène et sécurité

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel
- Toujours manipuler en présence d'une flamme ou sous une hotte.
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminants
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme

- Eviter les bouteilles déposées au bord des paillasse
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de robinet et au savon anti-bactéricide.

## **7. Post analytique**

### **7.1. Validation Biologique**

Réservé au biologiste ou ses assistants.

Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur.

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

### **7.2. Hygiène et sécurité**

Lors des manipulations, il faut toujours :

- Porter des gants
- Essuyer l'automate avec un papier essuie tout imbibé de javel dilué au 1/10
- Mettre les matériels souillés dans la poubelle réservée aux déchets contaminés
- Nettoyage de la paillasse avec de l'eau de javel à 3° Cl au début et à la fin de la journée.

### **7.3. Gestion des déchets**

Vider à chaque fin de journée les boites de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotché et déporté à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance.

### **7.4. Archivage**

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives.

### 4.3 Annexe n°3: MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Sandrine	S	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Nana Kadidia	NK	Visa :
Approuvé le:	25/03/2016	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Abderrhamane	AM	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en application	25/04/2016			Version N°
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

X Document opérationnel

- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de

Bamako

P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002

MO:

D:

E:

I - Buts

Décrire le mode d'utilisation du vitek 2 Compact.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV - Références

Manuel d'utilisation du Vitek 2 Compact

V - Contenu

1. Principe

Le système Vitek 2 Compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.

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

2. Mode opératoire

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

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

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;

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

NB : différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
- Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233
- ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083;entérobactéries: AST-N 233, réf 413117
- Levures : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-YS01, réf 22108
- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;
  - Cliquer sur Vitek 2
  - Mettre Identifiant : labsuper, le mot de passe : labsuper
  - Cliquer sur gérer la cassette virtuelle
  - Créer une cassette virtuelle
  - Identification de la cassette 1,2,...

- Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette
- Saisir les données de l'isolat ;
- Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)
- Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle
- Au niveau de l'automate Vitek 2 Compact,
- Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre ;
- Fermer le capot de remplissage ;
- Appuyer sur la touche Lancer remplissage, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;
- Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. Le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;
- Lorsque le message retiré s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le Vitek 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant le capot chargement puis le refermer ;
- On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

### 3. Résultats

Le Vitek 2 Compact est un appareil qui permet d'identifier les germes et de réaliser l'antibiogramme puis d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle puis la sensibilité naturelle du germe.

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

### 4. Gestion des déchets

- Retrait des cartes éjectées :  
Pour éjecter une carte, le Vitek 2 Compact la retire du carrousel/incubateur, la présente au lecteur de cartes et la dépose dans le récipient collecteur de déchets. Le

réceptacle collecteur de déchet peut contenir jusqu'à 60 cartes, il est recommandé de contrôler régulièrement le niveau du réceptacle collecteur de déchet et le vider.

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

Le Vitek 2 Compact réinitialise le compteur de déchets si le réceptacle est entièrement vidé.

#### 4.4 Annexe n°4: MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

Rédigé le:	24/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	03/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K.	AL	Visa :
Vérifié le :	22/04/2016	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	22/04/2016	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en application	22/05/2016			Version N°
Date de revue :	22/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I - Buts

Décrire la technique du test de la catalase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

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

### III- Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV- Références

### V- Contenu

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

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

### 2. Principe

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

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

### 3. Matériel

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

### 4. Contrôle de qualité

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

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- La catalase est positive
- La catalase est négative

### 5. Réalisation du test

Laisser les flacons revenir à température ambiante

- Test sur lame

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, Déposer sur la lame une goutte d'ID color catalase ;
  - Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ;
  - A l'aide d'un bâtonnet, bien triturer.
- Test direct sur le milieu de culture
  - Déposer une goutte d'ID color catalase directement sur la colonie.

## 6. Résultat

Le test doit être réalisé sur des colonies de 18 à 24 heures après incubation.

Les colonies plus âgées pourraient perdre leur catalase et donner des faux négatifs. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles;

Les entérobactéries sont toutes des bactéries catalase positive, à l'exception de *Shigella dysenteriae* ; Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont en général, catalase positive telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*... ;

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

## 7. Gestion des déchets

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

## 4.5 Annexe n°5: MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE

Rédigé le:	20/02/200	Par : Al Hadji SIDIBE	AL	Visa :
Vérifié le:	07/03/200	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	11/03/200	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	23/02/201	Par : AHANOGBE Lem K.	AL	Visa :
Vérifié le :	25/03/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/04/201	Par : Dr Madiné TALL		Visa :
Mise en application	25/05/201			Version N° 2
Date de revue :	25/05/201			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I - Buts

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

II - Domaines et personnels concernés

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

### III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV - Références

### V- Contenu

#### 1. Principe

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

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

#### 2. Matériel

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

#### 3. Conservation des disques

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

#### 4. Nature du prélèvement

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

#### 5. Contrôle de qualité

L'activité des disques peut être vérifiée sur gélose au sang frais avec la souche suivante : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Avec la zone d'inhibition après 24heures à 37°C : 15 à 35mm.

#### 6. Réalisation du test

- Laisser le flacon de disques revenir à température ambiante ;
- A partir d'une ou plusieurs colonies de la souche à tester, ensemencer en tries serrées une boîte de gélose au sang afin d'obtenir des colonies confluentes ;

- Déposer un disque d'optochine à la surface de la boîte ensemencée ;
- Placer la boîte en atmosphère appropriée (enrichie en CO<sub>2</sub>);
- Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C pendant 24heures.

## 7. Résultat

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

## 4.6 Annexe n°6: MODE OPERATOIRE DU TEST A LA BACITRACINE

Rédigé le:	23/02/201	Par : AHANOGBE Lem K.	AL	Visa :
Vérifié le:	25/03/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/201	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/05/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/05/201	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en application	25/06/201	Par :		Version N° 1
Date de revue :	25/05/201			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I- Buts

Décrire la technique du test à la bacitracine en microbiologie.

II- Domaines et personnels concernés

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

### III- Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV- Références

### V- Contenu

#### 1. Principe

Le test à la Bacitracine est un test utile pour l'identification des micro-organismes du Groupe A des *Streptococcus*. La plupart des souches de *Streptococcus* de Groupe A est inhibée par la Bacitracine alors que les autres *Streptococcus* ne le sont pas. Ce test est seulement fait en cas de Catalase négative, avec les cocci ayant une hémolyse Bêta sur la gélose au sang.

#### 2. Matériel

- Incubateur à CO<sub>2</sub> ;
- Etuve bactériologique;
- Disque de bacitracine.

#### 3. Conservation des disques

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

#### 4. Nature du prélèvement

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

#### 5. Contrôle de qualité

L'activité des disques peut être vérifiée sur gélose au sang frais avec la souche suivante : Streptocoque Bêta- hémolytique de groupe A.

#### 6. Réalisation du test

- Ensemencer une colonie de Streptocoque Bêta- hémolytique sur une boîte de gélose au sang.

- Dans la partie contenant le plus d'inoculum (c'est-à-dire, le premier domaine d'inoculation) placer un disque (A) de Bacitracine de 0,4 unité.
- Incuber la boîte de gélose au sang dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> pendant la nuit.
- Le lendemain de l'incubation, toute zone d'inhibition observée autour du disque de Bacitracine sera interprétée comme étant susceptible (c'est-à-dire positif).

## 7. Résultat

- Lecture et interprétation
  - Susceptible = l'inhibition de la croissance autour du disque de Bacitracine.
  - Résistant = pas d'inhibition de la croissance. Les micro-organismes *Streptococcus* du groupe A, sont inhibés par la Bacitracine. Les autres micro-organismes *Streptococcus* Bêta- hémolytique ne le sont pas.



Aspect du test négatif



Aspect du test positif

Figures du Test à la Bacitracine (Disque A)

## 4.7 Annexe n°7: MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	02/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	TZ	Visa :
Vérifié le :	25/03/2016	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/04/2016	Par : Dr Madiné TALL		Visa :
Mise en application	25/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	25/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I- Buts

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

II- Domaines et personnels concernés

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

### III- Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV- Références

### V- Contenu

#### 1. Principe

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

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

#### 2. Matériel

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

#### 3. Consommable

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

#### 4. Réactif

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

#### 5. Nature du prélèvement

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

#### 6. Contrôle de qualité

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

## 7. Technique

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

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;
- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30secondes
- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ;
- Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

## 8. Résultat

A la coloration de Gram :

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

## 4.8 Annexe n°8 Titre: MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Vérifié le:	22/02/2013	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	22/02/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:	22/02/2016	Par : Dr Lassina TIMBINE	LT	Visa :
Vérifié le :	22/02/2017	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/02/2017	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en application	22/02/2016			Version N°
Date de revue :	22/02/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité  
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I- Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de coloration de

Gram.

II-Domains et personnels concernés

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

### III- Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

### IV- Références

### V- Contenu

#### 1. Prince

Le souchothèque est un moyen permettant de conserver les souches bactériennes. La température de conservation à longue durée pour les bouillons glycélinés est de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pour la conservation à température ambiante la culture se fait en gélose profonde dans des tubes à hémolyse sellés.

#### 2. Matériel

- Portoir tube
- Tube à hémolyse
- Micropipettes
- Embouts
- Cryotubes
- Tubes à vis
- Marqueur
- Congélateur ( $-80^{\circ}\text{C}$ )

#### 3. Réactif

- Glycérol
- Milieu Müller Hinton ou BCC ou TCS

#### 4. Nature du prélèvement

Souche pure des bactéries.

#### 5. Enregistrement

Cahier de souchothèque et fichier électronique

#### 6. Technique

##### 6.1. Conservation longue durée

- Prendre un tube à hémolyse sur lequel on portera le numéro d'identification du patient et le nom de la bactérie à soucher ;

- Prendre le milieu Müller Hinton (MH) et remplir le tube à hémolyse jusqu'à moitié ;
- Prélever à l'aide d'une hanse quelques colonies isolées à partir de la purification qu'on introduira dans le MH, bien mélanger ;
- Mettre une étiquette portant le numéro de la souche correspondant aux trois 1ère lettres et chiffres du CODAT plus deux lettres de la souche plus le numéro d'ordre ; ex : W04ECO001 (1er E. coli souche en Avril 2012) ;
- Prendre soin de porter l'enregistrement dans un classeur prévu à cet effet ;
- Mesurer 800µl de la suspension déjà préparée, mélanger avec 200µl de glycérol puis agiter au vortex repartir dans les Cryotubes et conserver à -80°C.
- Préparer un bouillon de Cœur Cerveille mélanger avec du glycérol à 15% répartir le mélange dans des Cryotubes à vis.
- Prendre les colonies d'une culture pure de 24heures de la souche à conserver isolée sur MH par raclage à l'aide d'écouvillon puis plonger l'écouvillon dans le bouillon ; triturer légèrement sur les parois des Cryotubes et conserver à -80°C.
- Ensemencer en culture profonde la souche dans du MH solide en tube, celer le tube à la flamme et conserver à la température ambiante.

## 6.2. Conservation courte durée

Elle consiste à effectuer des repiquages en milieu gélosé en tube et conservation à l'obscurité à la température ambiante.

## 7. Application des contrôles de qualité en bactériologie à partir des souches de référence

Pour cette activité il est nécessaire de rendre les souches de référence disponibles les souches de référence.

## 8. Mise en place des évaluations externes de la qualité en bactériologie

Pour cette activité il y a lieu de choisir des laboratoires de référence soit à Lyon ou dans autres pays où le plateau technique est plus élevé.

NB : deux thèmes de recherche sur les résistances bactériennes aux antibiotiques.

## 9. Gestion des déchets

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

## 4.9 Annexe n°9: PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Rédigé le:	02 /06	Par : Quentin MASSOT	QM	Visa :
Vérifié le:	03/06/2011	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	03/06/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	03/06/2016	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	03/06/2016	Par : Dr Madiné TALL	MTT	Visa :
Mise en	03/07/2016			Version N°
Date de revue :	03/06/2017			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : Classeur Assurance Qualité

Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO:

D:

E:

### I. Buts

Décrire la méthode pour préparer les milieux de cultures essentiels à l'étude des bactéries.

### II. Domaines et personnels concernés

Tout le secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

### III. Abréviations/Définitions

### IV. Références

### V. Contenu

#### 1. Principe

Cette procédure doit expliquer la façon de préparer les milieux de cultures, qui sont nécessaires aux analyses de bactériologie.

#### 2. Matériel

- Erlenmeyer ;
- Spatule ;
- Barreau aimanté.

#### 3. Consommable

- Papier d'aluminium

#### 4. Réactif

- Eau distillée
- Milieux de cultures déshydratés (voir tableau ci-dessous).

#### 5. Mode Opératoire

- Stériliser d'abord un erlenmeyer de la contenance souhaitée.

Ajuster à la quantité souhaitée l'erlenmeyer avec de l'eau distillée et ajouter le barreau aimanté.

---

- Peser puis insérer la poudre déshydratée du milieu désiré dans l'erenmeyer : Le rapport quantité / poids est noté sur chaque boîte ainsi que sur le tableau ci-dessous.
- Porter le tout à ébullition sur une plaque chauffante avec l'agitateur jusqu'à ébullition
- La nécessité de l'autoclavage est notée sur les boîtes et sur le tableau ci-dessous.

Milieu	Quantité de poudre pour 300 Millilitres d'eau	Quantité de poudre pour 1 litre d'eau	Autoclavage
Bouillon Cœur / Cerveille	11,10 g	37 g	15 mn à 120°C
Müeller Hinton	10,50 g	35g	15 mn à 121°C
Chapman	33,30 g	111 g	15 mn à 120°C
UriSelect 4	17,04 g	56,8 g	15 mn à 120°C
Drigalski	14,70 g	49 g	15 mn à 115°C
Hektoen	22,50 g	75 g	Non : Bain marie (45-50°C) jusqu'au coulage
Gélose au sang Chocolat (Columbia)	11,70 g	39 g	15 mn à 120°C
Gélose Sabouraud Chloramphénicol	13,65 g	45,5 g	15 mn à 120°C

## 6. Hygiène et sécurité

### 6.1. Evaluation des risques

	Indice	Degré de gravité
Gravité	1	Très peu grave
	2	Peu grave
	3	Grave
	4	Très grave
	5	Excessivement grave- Mortel

Type de risque	Circonstances	Localité	Risque	En cause	Gravité	Moyen(s) de prévention
Infectieux	Stériliser la verrerie dans l'autoclave	Salle des milieux de culture	Contamination	Manutention sans gants	2	Mettre des gants lors du déplacement des objets et bien se laver les mains après.
Infectieux	Préparation de milieux	Salle des milieux de culture	Contamination des milieux = résultats faux	Salle insalubre	2	Nettoyer le local afin que toute contamination soit au maximum évitée
Electrique	Onduleur dans une pièce humide et sale	Salle des milieux de culture	Court circuit	Poussière et humidité	3	Aérer et nettoyer régulièrement
Machinerie	Panne autoclave	Salle des milieux de culture	Ne pas pouvoir stériliser des matériaux	Dysfonctionnement de l'appareil / mauvais entretien	3	Bien entretenir les machines / avoir des pièces de rechange
Machinerie	Panne plaques chauffantes	Salle des milieux de culture	Ne plus pouvoir préparer les milieux	Dysfonctionnement de l'appareil	3	Avoir une plaque de rechange disponible
Chute d'objets / Produits	Chute d'objets lourds: casque de moto / verrerie	Salle des milieux de culture	Blessure, casse	Objets cassant en hauteur, objets qui n'ont pas à être là	3	Mettre ailleurs les objets qui n'ont pas à être là et essayer de ranger la verrerie sur la paillasse

Chute d'objets / Produits	Chute des pots contenant les poudres	Salle des milieux de culture	Blessure, casse	Pièce humide, étagères en mauvais état	2	Vérifier les étagères annuellement
---------------------------	--------------------------------------	------------------------------	-----------------	----------------------------------------	---	------------------------------------

---

## 6.2. Nettoyage de la salle

La salle doit être aérée puis nettoyée hebdomadairement afin de garantir une atmosphère la moins chargée possible en poussières.

## 6.3. Evacuation des eaux usées

L'évacuation des eaux usées se fait par l'évacuation au sol, situé sous le lavabo (autoclave). Il faut bien faire attention à mettre le tuyau d'évacuation, dans le trou afin d'éviter au maximum les projections d'eau et /ou inondation dans la salle

## 7. Archivage

L'archivage de la procédure se fera lors de toute modification faite sur la préparation des milieux de culture (ajout ou retrait de milieux de la liste, arrêt des préparations, changement de méthode).

---

## SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

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

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

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

**Je le jure**

---

