

MINISTRE DES ENSEIGNEMENTS
SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE DU MALI

Un Peuple-Un But – Une Foi

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DE TECHNOLOGIES DE BAMAKO



FACULTE DE PHARMACIE



Année Universitaire : 2013 - 2014

N°...../ P

TITRE

**PREVALENCE DES BACTERIES ISOLEESDES
HEMOCULTURES ET DES
EXPECTORATIONS INDUITESCHEZ LES
ENFANTS ADMIS POUR CAUSE DE
PNEUMONIE AU CHU GABRIEL TOURE.**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement le /...../ 2014 devant la Faculté de Pharmacie

Par M. Mamadou Alpha DIALLO

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

Jury

Président: Pr Ibrahimzatiegouma MAIGA

Membre : Dr Seydou DIARRA

Membre : Dr Aliou TOURE

Co-Directeur: Dr Almoustapha Issiaka MAIGA

Directeur de Thèse : Pr Souleymane DIALLO II

DEDICACES

Je dédie cette thèse :

A la mémoire de notre père: Feu Alpha DIALLO

Paix à son âme. Ce travail est sans doute le fruit de tous les sacrifices que tu as consentis de ton vivant. En effet, tu as été pour moi un exemple de courage, de persévérance et d'honnêteté dans l'accomplissement du travail bien fait. Merci pour ton courage et tous les efforts fournis pour notre scolarisation dans un environnement hostile. Tu m'as appris le sens de l'honneur, de la dignité et de la justice. Puisse ce travail m'offrir l'occasion de me rendre digne de tes conseils et d'honorer ta mémoire. Que DIEU t'accueille dans son paradis. Amen !

A ma chère et tendre mère : Djéneba SOGODOGO

Maman, tu n'as ménagé aucun effort pour peaufiner ma personnalité et pour la réalisation de ce travail qui est le tien.

Si tes genoux continuent à s'user dans la prière, c'est sûrement pour nous.

Puisse Dieu te combler au-delà de toute attente.

A mon oncle feu Ibrahima SOGODOGO et ma tante Djéneba TRAORE à NIENA.

Vous aviez été plus qu'un oncle et tante pour moi. Si je suis à ce niveau aujourd'hui, c'est grâce à votre soutien. Vous m'avez protégé à l'ombre de vos ailes pour que mes études ne souffrent d'aucun aléa. Je suis très fier de l'éducation que j'ai reçue de vous.

Pardonnez-moi, s'il m'est arrivé un jour de vous décevoir sans le savoir. Je vous serai toujours reconnaissant.

Merci pour l'amour sans faille et Dieu saura vous récompenser au-delà de toute espérance. Amen !

A mes oncles, Moussa et Thiécoura SOGODOGO, Souleymane et Drissa DIARRA

Les mots me manquent pour vous dire combien je tiens à vous, s'il est arrivé ce jour c'est grâce à vos patiences et attentions. Vos soutiens indéfectibles ne m'ont jamais fait défaut. Trouvez ici mes sentiments de profonde gratitude.

A mon frère et sœurs : Mandiou et Assou, Fatoumata, Awa, Sira Diallo.

Vous avez été en grande partie dans la réalisation de ce document qui aussi est vôtre. Que Dieu me donne la force de vous en être reconnaissant toute ma vie.

A mes tantes : Kadi, Assétou et Adji SOGODOGO

Vos différents soutiens ne m'ont jamais manqué ; que DIEU fasse que je ne les oublie jamais.

A mes cousins et cousines :

J'ai pu compter sur le soutien de chacun de vous chaque fois que le besoin s'est fait sentir ; recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

A mon oncle et ma Grand-Mère:

Feu Nouhoum CISSE et Feu Fatoumata TOUNKARA, Vous avez été arrachés à notre affection, cependant vous continuez à faire partie de notre existence.

REMERCIEMENTS

A Allah le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Que la paix et la bénédiction d'ALLAH soient sur notre prophète Mohamed, sa famille, ses compagnons et quiconque suit sa guidée.

Aux familles

DIABATE à Doumazana, DIARRA à Bolibana et Korofina, CISSE à l'Hippodrome, DIALLO à Badialan III, COULIBALY à KalabanCoura et CISSE à Boukassoumbougou. Recevez ici l'expression de ma reconnaissance.

A mes beaux Frères

I COULIBALY, KOUREISSI, I MAIGA et Ismail. Merci pour vos conseils et vos soutiens matériels et moraux.

A mes amis (es) les plus chers

Daouda DIABATE, Dr Kardigué KAMISSOKO, Seydou DENA, MOUSSA DOUCOURE, METANGA GNISSAMA, DR LASS, MALICK DOUCOURE, Ganda, Balam, A.Boubawa, Sibiri.

Certes la meilleure union est celle fondée sur la piété. Qu'Allah ne fasse pas dévier nos cœurs après nous avoir guidés.

A mes camarades Faisant Fonction Interne du Service

Moussa SANOGO , Sounkarou TRAORÉ , Seydou DOUMBIA dit Papin. Ensemble on a su regrouper nos forces afin de nous aider mutuellement pour franchir les différents obstacles de la vie estudiantine.

Je vous dis encore Merci pour votre courage et votre persévérance et surtout pour vos soutiens dans les peines partagées.

Qu'ALLAH nous assiste dans nos vies professionnelles

A mes aînés :

Dr Allaye TRAORE, Dr Namory CAMARA, Dr Hamadoun MAIGA, Dr Aliou BALDE, Mme SANOGO Aichata SACKO, Maimouna COULIBALY.

Votre disponibilité, votre amour du travail bien fait, votre esprit scientifique, votre compétence, votre simplicité, m'ont émerveillé durant mon séjour au laboratoire.

Merci pour vos contributions à la réalisation de ce travail.

A tout le personnel du Laboratoire d'Analyses Médicales du CHU GT et du laboratoire CVD- CNAM, notamment,

Dr Boubou TAMBOURA Dr Dramane MALLE, Dr Azize, Dr TEMBINE, Dr Mariam SAMAKE, Dr Oumar TRAORE.

Merci pour l'expérience acquise auprès de vous.

A tout le Personnel du CVD- Pédiatrie du CHU-GT :

Merci pour la bonne collaboration.

A tout le personnel de l'ASACO de Sangarébougou.

Merci pour la bonne collaboration.

Au Dr SOUMARE Fatoumata KANTA, titulaire de la pharmacie Bounai, j'ai été émerveillé par l'intérêt que vous accordez à l'encadrement des étudiants. Votre esprit d'ouverture, votre modestie et votre amour du travail bien fait font de vous un maître inoubliable et hautement respecté.

Trouvez ici l'expression de notre profond respect. Qu'Allah vous accorde belle part ici-bas et belle part dans l'au-delà Amen !

A tout le personnel de la pharmacie Bounai

Trouvez ici l'expression de mon Profond respect.

Au Dr MOUGARE: Assistant titulaire à la Pharmacie Bounai

Recevez ici l'expression de ma reconnaissance. Votre rigueur et amour du travail bien fait font de vous un maître inoubliable et hautement respecté.

Au Pr Amadou Diallo Professeur à la retraite Ex Recteur de l'Université de Bamako et chargé de cours de Biologie animale à la FAPH.

La rigueur et la qualité scientifique de votre enseignement ; votre disponibilité constante ainsi que les qualités humaines qui vous caractérisent ont forcé notre admiration.

Merci pour vos conseils et vos soutiens. Je formule des vœux sincères pour vos bonheurs respectifs.

Au Dr SANGARE Samba Adama Assistant en Bactériologie à la FAPH.

Merci pour votre contribution à ce travail.

A tout le corps professoral de la FMOS - FAPH

Je vous témoigne toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements pour l'enseignement et les encadrements reçus.

A tous mes maîtres depuis le primaire

Vous avez toutes mes considérations et je vous suis parfaitement reconnaissant pour toute la formation que vous m'avez donnée. Merci pour tout.

A tout le Personnel du laboratoire Gabriel TOURE : Major Youssouf TOURE, Amadou KEITA et les autres techniciens.

A tous mes camarades de la promotion "**Pr. Souleymane Diallo II**".

A mes cadets du service et de la FMOS-FAPH

Merci pour le respect et la confiance.

Courage et détermination.

A toutes les personnes de bonne volonté de près ou de loin qui ont contribué à la bonne réussite de ce travail.

Qu'elles en soient remerciées.

En fin nous rendons hommage aux amis qui nous ont quittés prématurément.

(Feux : **Ousmane KONATE, Oumar KANE**) après toutes ces années d'études pharmaceutiques, qu'ALLAH leurs accordent sa grâce éternelle. Amen !

Hommages aux membres du jury

A notre Maître et Président du jury

Pr Ibrahim IzetiegoumaMAIGA

- **Professeur de Bactériologie-Virologie à la FMOS;**
- **Responsable des cours de Bactériologie-Virologie à la FMOS;**
- **Chef de service du laboratoire de Biologie et d'Hygiène hospitalière au CHU du Point G;**
- **Vice doyen de la FMOS.**

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

Votre dynamisme, votre sens du travail parfait, vos qualités humaines et surtout votre très grande culture scientifique ont forcé notre admiration. Nous espérons avoir fait honneur à vos qualités incontestables de Maître. Nous sommes honorés d'être compté parmi vos élèves. Trouvez dans ce travail toute notre reconnaissance et notre fidèle attachement.

Qu'ALLAH vous bénisse. Amen.

A notre Maître et juge

Dr Seydou DIARRA

- **Spécialiste en Microbiologie**
- **Chef de Service du laboratoire de Bactériologie –Virologie de l'INRSPde Bamako.**
- **Maître chargé de l'Enseignement de la Bactériologie à l'Institut de Formation des techniciens de laboratoire.**

Cher maître, nous avons été très impressionnés par la simplicité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail .votre rigueur pour le travail bien fait, votre disponibilité et votre souci pour la formation de vos élèves font de vous un maître exemplaire. Vos critiques et suggestions ont contribué à améliorer la qualité de ce travail.

Trouvez, cher maître, l'expression de notre profonde gratitude et sincère respect.

A notre Maitre et juge,

Dr Aliou TOURE

- **Pharmacien**
- **Superviseur au laboratoire CVD du CHU GABRIEL TOURE**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

Nous avons été comblés par votre accueil et votre disponibilité. Nous gardons de vous l'image d'un homme de sciences rempli d'esprit de recherche.

Recevez ici cher maître l'expression de notre profonde considération.

A Notre Maitre et co-directeur de thèse

DrAlmoustapha Issiaka MAIGA

- **Pharmacien et PhD en virologie à l'école doctorale Complexité du vivant (EdV) de l'Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Paris 6.**
- **Directeur du laboratoire de Virologie au Centre de Recherche et de Formation sur VIH et la TB (SEREFO).**
- **Chef de service du laboratoire d'analyses biomédicales du CHU Gabriel Touré.**
- **Membre de plusieurs sociétés savantes internationales sur le VIH dans le monde.**

Cher Maître

Les mots ne peuvent pas exprimer avec exactitude notre profonde admiration et notre profond respect. Vous nous avez suivi et guidé pas à pas dans l'élaboration de ce travail. Votre rigueur dans le travail, votre dévouement sans limite et votre générosité sont des qualités que nous nous efforcerons d'approcher. Nous sommes aujourd'hui comblés d'une immense joie de vous connaître et d'être votre éternel disciple.

Nous vous remercions, cher Maître, pour la patience bien que vous avez eu à notre égard durant toute notre formation.

Recevez ici notre gratitude et notre attachement total.

Qu'ALLAH vous protège. Amen.

A notre Maître et directeur de thèse

Pr Souleymane DIALLO II,

- **Pharmacien biologiste des services de santé des armées**
- **Colonel Major de l'armée Malienne**
- **Maître de conférences en bactériologie et virologie à la Faculté de Pharmacie**
- **Coordinateur du projet hygiène des mains et sécurité des patients au CHU Gabriel TOURE**
- **Directeur général du centre d'infectiologie Charles Mérieux de Bamako**

Ce travail est sans doute le fruit de vos efforts. Votre rigueur scientifique, votre esprit d'ouverture et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple à suivre. Soyez rassuré que vos nombreux conseils et enseignements n'auront pas été vains et que nous sommes très fiers d'être compté parmi vos élèves. Nous garderons de vous l'image d'un homme de science d'une extrême ténacité et d'un enseignant soucieux de la formation de ses élèves.

En espérant que cet humble travail saura combler votre attente, veuillez recevoir cher maître, l'expression de notre profonde reconnaissance.

Qu'ALLAH vous donne longue et heureuse vie.

Liste des Abréviations et Sigles

BA : Gélose au sang

BGP : Bacilles Gram Positif

BGN : Bacilles Gram Négatif

BHB : Bacitracin sang chauffé

BPCO: Broncho-pneumopathie chronique obstructive

°C= Celsius

CGPch : Cocci Gram Positif en chaînette

CGPgr : Cocci Gram Positif en grappe

CGPpr : Cocci Gram Positif en paire

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CHOC :Gelose au sang cuit (ou gelose chocola)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNAM : Centre National d' Appui à la lutte Contre la maladie

CoccoBGN : Cocco Bacille Gram Négatif

CO₂= Dioxyde de Carbone

CVD : Centre pour le Développement des Vaccins

DCGN : Diplocoque Gram Négatif

dl= décilitre

ECG= Electrocardiogramme

EDS : Enquête Démographique et de Santé

IEC :Informations, Educations et Communications

FAPH : Faculté de Pharmacie

G ou g : Gramme

GB= Globule blancs

Hg= Mercure

Hib= *Haemophilus influenzae* type b

HPF : Champs à fort grossissement (x100 objectif, immersion a l'huile)

IEC: Information Education Communication

IgA = Immunoglobuline A

IgM = Immunoglobuline M

INRSP : Institut National de Recherche en Santé Publique

IRA = Infections respiratoires aiguës

IRBA = Infections respiratoires aiguës basses

IRB = Infections respiratoires basses

J : Jour

Kg : Kilogramme

l= litre

LCR = Liquide céphalo rachidien

LPF :Champs a faible grossissement (x10 objectif)

MAC : Gélose MacConkey

Mg ou mg : Milligramme

mm= millimètre

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPF: Oropharygeal flora (some laboratories use the term " normal respiratory flora (NRF)" or similar terms instead).

ORL: Oto-Rhino-Laryngologie

PCR: « Polymerase by Chain Reaction »

PEV: Programme Elargi de vaccination

PPE :Equipement de Protection Individuel

SIBI: Suspicion infection bactérienne invasive

SOP: Standard Operating Procédure

USA: United States of America

VIH : Virus de l'immunodéficience Humain

µl : microlitre

SOMMAIRE

PLAN

1-INTRODUCTION

-OBJECTIFS

2 -GENERALITES

3 -METHODOLOGIE

4 -RESULTATS

5 -COMMENTAIRES ET DISCUSSION

6-CONCLUSION ET

RECOMMENDATIONS

7-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

8-ANNEXES

Table des matières

1-Introduction	2
Objectifs	3
Objectif général	3
Objectifs spécifiques	3
2-Généralités	5
2.1. Définition	5
2.2. Epidémiologie	5
2.3. Physiopathologie	6
2.3.1 Moyens de défense	6
2.3.2 Voies de contamination	7
2.3.3. Facteurs de risque et Etiopathogénie	7
2.3.3.1. Facteurs de risque	7
2.3.3.2. Etiopathogénie	9
2.3.3.2.1 Les virus	9
2.3.3.2.2. Bactéries	9
2.4. Rappels Clinique	10
2.4.1.La bronchopneumonie	10
2.4.2.Pneumonie franche lobaire aigue	11
2.4.3. Pneumonie à staphylocoque	15
2.4.4.Pneumonie à streptocoques	15
2.4.5. Pneumonies à germes Gram négatif	16
2.4.5.1. La pneumonie à <i>Haemophilus influenzae</i>	16
2.4.5.2.La pneumonie à <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
2.4.5.3.La pneumonie à Bactéroides	16
2.4.5.4. <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	16
2.4.5.5. La pneumonie à <i>Légionella</i>	16
2.4.5.6. Pneumonie à <i>Chlamydia pneumoniae</i>	18
2.4.5.7.Pneumonie à mycoplasmes	18
2.4.6 Stratégie thérapeutique devant une pneumopathie communautaire	20
2.4.6.1. Quand hospitaliser ?	20
2.4.6.2 Quelle antibiothérapie ?	20

2.4.6.3 Quels traitements en dehors de l'antibiothérapie-----	21
3-Méthodologie-----	28
3.1.Cadre et lieu d'étude-----	28
3.2.Type d'étude-----	29
3.3 Durée de l'étude-----	29
3.4 Critères d'inclusion et de non – inclusion-----	29
3.4.1. Critères d'inclusion-----	29
3.4.2. Critères de non inclusion-----	29
3.5. Description de la méthode-----	30
3.5.1. Protocole de technique des hémocultures positives-----	31
3.5.1.1. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries-----	34
3.5.1.1.1. Coloration de Gram-----	34
3.5.1.1.2. Tests biochimiques et métaboliques-----	36
• Observation de la réaction d'Hémolyse-----	36
3.5.1.1.3 Catalase-----	37
3.5.1.1.4 Test à l'Optochine (disque P) -----	38
3.5.1.1.5. Test de sensibilité aux antibiotiques-----	39
3.5.2. Protocole de traitement de l'expectoration induite au laboratoire----	47
3.5.3 Traitement informatique des données-----	58
3.5.4 Aspects éthiques-----	58
3.5.4.1. Consentement des malades-----	58
3.5.4.2. Inconvénients potentiels de cette étude-----	58
3.5.4.3. Bénéfices-----	59
4-Résultats-----	61
4.1. Présentation des résultats-----	61
4.2. Description des résultats-----	61
5-Commentaires et Discussion-----	81
5.1. Difficultés et limites de l'étude-----	83
5.2. Epidémiologie-----	83
5.2.1. Fréquence-----	83
5.2.2 .Sexe et Age-----	83
5.2.3. Résidence-----	83
5.2.4 Saisonnalité-----	84

5.2.5 Bactériologie-----	84
5.2.6 Sensibilités aux antibiotiques-----	85
5.2.7 Devenir des malades-----	86
6-Conclusion – Recommandations-----	88
6.1. Conclusion-----	88
6.2. Recommandations-----	90
7-Références Bibliographiques-----	92
8-Annexes-----	98

Liste des TABLEAUX

Liste des TABLEAUX

<u>TABLEAU I</u> : Arguments différentiels entre pneumopathies bactériennes et virales-----	
	-26
<u>TABLEAU II</u> : Direction pour la notification des agents pathogènes dans les expectorations induites-----	55
<u>TABLEAU III</u> : Répartition selon la tranche d'âge-----	62
<u>TABLEAU IV</u> : Répartition des patients selon la résidence-----	62
<u>TABLEAU V</u> : Prévalence des bactéries isolées dans les hémocultures-----	64
<u>TABLEAU VI</u> : Prévalence des bactéries isolées dans les expectorations induites-----	
	-65
<u>TABLEAU VII</u> : Prévalence des principales bactéries isolées dans les hémocultures en fonction du sexe -----	
	--66
<u>TABLEAU VIII</u> : Prévalence des principales bactéries isolées dans les hémocultures en fonction de la tranche d'âge-----	
	--67
<u>TABLEAU IX</u> : Prévalence des bactéries isolées dans les hémocultures en fonction de la résidence-----	68
<u>TABLEAUX</u> : Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction du sexe-----	69
<u>TABLEAU XI</u> : Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction de la tranche d'âge -----	
	-70
<u>TABLEAU XII</u> : Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction de la résidence-----	
	-71

<u>TABLEAU XIII</u> : Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques-----	74
<u>TABLEAU XIV</u> : Sensibilité de <i>l'Haemophilus influenzae type b</i> (Hib) aux antibiotiques-----	74
<u>TABLEAU XV</u> : Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques-----	75
<u>TABLEAU XVI</u> : Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques dans les expectorations induites-----	75
<u>TABLEAU XVII</u> : Sensibilité de <i>l' Haemophilus influenzae</i> dans les expectorations induites-----	-76
<u>TABLEAU XVIII</u> : Sensibilité de <i>Staphylococcus aureus</i> aux antibiotiques dans les expectorations-----	76
<u>TABLEAU XIX</u> : Répartition des Patients selon le devenir-----	77
<u>TABLEAU XX</u> : Répartition du devenir des patients selon la tranche d'âge-----	78
<u>TABLEAU XXI</u> : Devenir des patients Selon les bactéries retrouvées-----	79

Liste des Figures

FIGURE I : Arbre décisionnel devant une pneumonie-----24

FIGURE II : Répartition des patients selon le sexe-----61

FIGURE III : Répartition des patients selon la période d'admission-----63

FIGURE IV: Répartition des 4 principales bactéries isolées dans les
hémocultures pendant la période d'étude-----
--72

FIGURE V: Fréquence d'isolement des 4 principales bactéries isolées dans
les expectorations induites pendant les Mois de la période d'étude-----
--73

INTRODUCTION

1-INTRODUCTION :

La pneumonie est une infection grave des poumons qui rend la respiration difficile. C'est une des raisons les plus courantes pour lesquelles les enfants sont hospitalisés. La pneumonie est généralement provoquée par des germes (virus et bactéries). [1]

Elle constitue une pathologie très fréquente, grave et très mortelle dans les pays en développement et représente un problème de Santé Publique. Elle est la première cause de mortalité chez l'enfant. On estime qu'elle tue chaque année 1,2 million d'enfants de moins de 5 ans, soit 18% des décès dans ce groupe d'âge à l'échelle mondiale. Elle affecte les enfants et les familles partout dans le monde, mais sa prévalence est la plus forte en Asie du Sud et en Afrique subsaharienne. Ces enfants peuvent être protégés grâce à des interventions simples et traités par des médicaments et des soins peu coûteux [2].

Les germes responsables sont très variés avec une prédominance du pneumocoque dont la proportion des souches résistantes croit de plus en plus pour atteindre de nos jours un niveau alarmant [3]. En France, 50% des pneumocoques sont à sensibilité diminuée ou résistants à la pénicilline G [4]. Dans les pays en développement aux ressources limitées le diagnostic étiologique de ces pneumopathies est onéreux et souvent impossible.

Dans les pays hautement médicalisés, l'étiologie de la pneumonie n'est déterminée que dans 40 à 60% des cas [4] malgré l'amélioration et la codification des techniques microbiologiques. Par conséquent, l'antibiothérapie est empirique dès que le diagnostic est posé, et adapté ultérieurement si nécessaire aux résultats microbiologiques [4]. De plus, la généralisation de la vaccination des jeunes enfants contre *Haemophilus influenzae* type b nécessite une évaluation répétée de son importance, d'autant que de nombreuses souches secrètent une betalactamase. Enfin, il est probable que l'insuffisance de recherche systémique, la fréquence des infections à mycoplasmes et à virus ont été sous estimées.

L'agent infectieux n'est pas toujours unique. Ainsi, il n'est pas exceptionnel de voir deux virus cohabiter (par exemple association

adenovirose-rougeole) et il est habituel de voir une infection virale faire le lit d'une infection bactérienne.

La pneumonie est l'infection respiratoire basse la plus meurtrière avec 80% des décès [5].

Très peu d'études ont été faites au Mali pour mettre en évidence les germes les plus fréquemment retrouvés dans les hémocultures et dans les expectorations induites. Depuis 2002 le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré dispose d'un site de CVD-MALI pour la surveillance épidémiologique des infections bactériennes invasives. Pour mieux appréhender les différents problèmes posés par ces infections, CVD-Mali s'est engagé à la recherche des causes de pneumonie chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie et chez les enfants vivants dans le district de Bamako.

Pour mener à bien ce travail nous nous sommes fixés comme objectifs ;

-OBJECTIFS

❖ Objectif général :

Déterminer les principales bactéries isolées des hémocultures et des expectorations induites chez les enfants admis pour cause de pneumonie en pédiatrie du CHU Gabriel Touré.

❖ Objectifs spécifiques :

- Déterminer la prévalence des principales bactéries isolées dans les hémocultures.
- Déterminer la prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites.
- Décrire le profil socio- démographique des enfants inclus pour cause de pneumonie.
- Préciser le profil antibiotique des principales bactéries retrouvées dans les hémocultures et les expectorations induites.
- Déterminer le devenir immédiat des patients.

GENERALITES

2-GENERALITES

2.1 DEFINITION :

Le terme de pneumonie ou de pneumopathie infectieuse désigne une atteinte inflammatoire d'origine infectieuse des structures du poumon profond (alvéoles, bronchioles, et interstitium) [6]. Il existe essentiellement trois formes anatomo-cliniques :

- pneumonie franche lobaire aiguë (atteinte alvéolaire, systématisée)
- bronchopneumonie (atteinte bronchiolo-alvéolaire en foyer non systématisé)
- pneumonie interstitielle diffuse ou localisée (pneumopathie atypique).

La pneumonie est dite communautaire lorsqu'elle est acquise dans la population générale en milieu extrahospitalier ou si elle se révèle dans les premières 48 heures de l'hospitalisation [7] (ce qui la différencie d'une pneumonie nosocomiale, acquise lors du séjour hospitalier). L'absence d'hospitalisation au minimum dans les sept (7) jours précédant l'épisode est également nécessaire pour affirmer le caractère communautaire. Les pneumonies des patients institutionnalisés (structure plus ou moins médicalisée) s'intègrent aux pneumonies communautaires.

2.2. EPIDEMIOLOGIE

2.2.1 Dans le monde :

Les pneumonies sont des infections fréquentes connues depuis l'Antiquité. La symptomatologie en fut décrite par Hippocrate.

Les infections respiratoires basses (IRB) représentent une part importante de la pathologie infectieuse pédiatrique et sont responsables de 10% des hospitalisations en pédiatrie générale [8]. Le jeune âge est un facteur de risque de l'infection puisque 80% des IRB surviennent avant l'âge de 7 ans. En 1988, 15% des décès à l'hôpital parmi les enfants de moins de 5 ans au SWAZILAND étaient imputables aux infections respiratoires aiguës (IRA) [9]. Les pneumopathies sont à l'origine du décès de 30 à 40% des enfants âgés de 0 à 1 an en Amérique latine [10;11].

2.2.2 **En Afrique :**

-Une étude faite au Burkina-Faso chez les enfants de 0 à 36 mois en 1994 a montré que les IRBA constituent la 2^{ème} cause (16,3%) des hospitalisations après le paludisme (28,7%) [12].

- Au Mali les IRA représentent la première cause de consultation pédiatrique et la deuxième cause de décès des enfants de 0 à 5 ans [13].

-En 1988 TRAORE M K [14] a trouvé un taux de mortalité de 37,12% dans la tranche d'âge de 0-4 ans.

En 1998 SYLLA M [15] trouve que les IRBA représentent 23,63% des motifs de consultation en milieu hospitalier, parmi lesquels 12% ont été hospitalisés.

2.3. **Physiopathologie**

2.3.1 **Moyens de défense** [16]

Chez l'individu sain, les voies aériennes sous glottiques sont normalement stériles.

Plusieurs mécanismes de défense vont protéger l'appareil respiratoire contre la colonisation et la multiplication microbienne permettant ainsi d'assurer la stérilité de l'arbre aérien.

Il s'agit de :

✚ **défense mécanique :** constituée de la filtration et de l'humidification de l'air inspiré par les voies aériennes supérieures, du réflexe de toux et de la déglutition, du transport mucociliaire.

✚ **défense humorale :** se composant de

• moyens non spécifiques :

- lysozyme, surfactant.

• moyens spécifiques :

- Ig A en majorité,

- Ig M.

✚ **défense cellulaire :**

• moyens non spécifiques :

- macrophage,

- polynucléaire (PN).

• moyens spécifiques :

- lymphocytes T,
- lymphocytes B.

2.3.2 Voies de contamination de l'appareil respiratoire

Elles sont essentiellement :

- **la voie aérienne (trachéo-bronchique)** par inhalation des germes, mode de contamination le plus fréquent des infections communautaires. Il s'agit de la voie descendante à partir de l'inhalation des germes extérieurs ou de l'ensemencement des voies respiratoires inférieures à partir d'une infection ORL ou bucco-dentaire.
- **la contiguïté anatomique** à partir d'une infection de voisinage (pleurésie purulente, médiastinite, abcès sous diaphragmatique,...)
- **la voie sanguine et lymphatique** à partir d'un foyer microbien, le poumon est atteint par diffusion lymphatique ou sanguine dans un contexte de bactériémie ou de septicémie.
- **l'inoculation directe**, accidentelle ou iatrogène responsable lors d'infections nosocomiales. Les deux premières voies sont les plus prépondérantes.

2.3.3 Facteurs de risque et étiopathogénie:

2.3.3.1 Facteurs de risque :

De nombreuses études ont mis en évidence la place des facteurs de risque dans l'importance des pneumopathies chez les enfants de moins de 5 ans.

La fréquence annuelle des épisodes de pneumopathie se trouve élevée grâce aux facteurs et aussi ces facteurs augmentent le risque de complication surtout de détresse respiratoire. Ceux reconnus par l'OMS sont :

La malnutrition et le faible poids de naissance, l'allaitement artificiel, l'avitaminose A, l'infection VIH, la rougeole, la diphtérie, et la coqueluche.

La malnutrition et le faible poids de naissance sont d'une manière générale les plus importants des facteurs de risque. Au MALI les enquêtes nutritionnelles ont permis d'établir que la malnutrition est plus marquée en milieu rural qu'urbain. Elle touche 25% des enfants âgés de 3 à 13 mois sous sa forme aiguë [EDS MALI 1987]. De 1980 à 1988, 17% des enfants avaient un poids inférieur à 2,5 Kg à la naissance [17]. La malnutrition, entraînant un affaiblissement des moyens de défense de l'organisme favorise

la survenue des infections. Cette réflexion est renforcée par la littérature qui nous rappelle les terrains à risque comme : les anciens prématurés et ou les hypotrophes, les enfants atteints de mucoviscidose ; les porteurs de déficits immunitaires (granulomatose septique chronique, déficit de l'immunité humorale) ; les enfants fragilisés par une cardiopathie [18]

Le lait maternel a un rôle protecteur de l'enfant contre les infections en renforçant son système immunitaire par l'apport d'anticorps [18].

L'allaitement artificiel : C'est un facteur de risque, heureusement les estimations du taux d'allaitement maternel à 6 mois et à 12 mois sont respectivement 95% et 82% pour la période allant jusqu'à 1991.

L'avitaminose A est un problème de santé publique car 2,7% des 951 enfants âgés de 0 à 6 ans d'une étude menée en juillet et août 1990 à BARAOUELI ; NIONO et SEGOU souffraient de cécité crépusculaire et 2,2% avaient des tâches de BITOT.

La fumée domestique Avec la fumée de tabac elle représente un risque accru d'IRBA chez les enfants, mais ce facteur est mal décrit au MALI.

L'infection par le VIH : Son importance est difficile à préciser mais on constate de plus en plus que l'infection VIH est un facteur important de morbidité par pneumopathie.

Le manque de vaccination contre la rougeole, la coqueluche, et la diphtérie constitue également un facteur de risque.

Facteurs prédisposant l'enfant à la détresse respiratoire [15]

La fréquence de la détresse respiratoire de l'enfant peut s'expliquer par l'immaturation de la fonction respiratoire, qu'il s'agisse du contrôle de la ventilation (qui est immature ce qui donne des rythmes respiratoires irréguliers avec des apnées), ou des muscles respiratoires et de la cage thoracique (contrairement à celle de l'adulte qui est ellipsoïdale , la cage thoracique de l'enfant est circulaire, l'angle d'insertion du diaphragme est presque horizontal ce qui diminue l'efficacité de la contraction du diaphragme, les fibres musculaires qui résistent à la fatigue sont diminuées dans le diaphragme du nouveau-né); des voies aériennes et du parenchyme pulmonaire (les résistances totales sont 8 fois plus élevées que chez l'adulte ; leur diamètre est proportionnellement étroit avant 5 ans).

2.3.3.2 **Etiopathogénie [19 ; 20]**

Les virus et les bactéries sont les principaux agents pathogènes responsables de broncho-pneumopathie chez l'enfant ; mais il est difficile de déterminer la part respective de ces agents. De nombreuses études étiologiques ont montré que les infections bactériennes viennent compliquer les infections virales.

2.3.3.2.1 **Les virus :**

Ce sont le virus syncytial respiratoire et les virus para influenza I et II ou rhinovirus.

Leur porte d'entrée est surtout nasale, ils entraînent des lésions locales ou étendues à tout le tractus respiratoire en se fixant sur les cellules épithéliales, par contre certains virus peuvent diffuser dans l'organisme.

L'organisme a 3 sortes de réactions face à l'agression virale :

- Réaction immuno-sécrétoire locale avec élévation des IgA sécrétoires
- Réaction humorale qui intéresse surtout les IgG et IgM sériques,
- Réaction cellulaire.

2.3.3.2.2 **Bactéries**

Les plus fréquentes sont : l'*Haemophilus influenzae*, le pneumocoque et le staphylocoque.

L'infection bactérienne intéresse surtout la partie sous glottique de l'appareil respiratoire. L'étendu, la localisation et la systématisation des lésions déterminent la gravité du tableau clinique.

- Le pneumocoque :

C'est le germe qui même s'il n'est pas le plus souvent en cause, doit être envisagé en premier car il donne les pneumonies les plus graves, quelquefois mortelles [21].

-L'*Haemophilus influenzae* type b:

La fréquence varie de 5 à 20% selon les séries et les pays. Fréquent dans le tiers-monde, il tend à diminuer dans les pays où la vaccination est courante. De plus, les infections à *Haemophilus* ont toujours été très caractéristiques du jeune enfant de moins de 1 an.

- Staphylocoque :

Il est devenu rare dans les pays occidentaux : 1% des causes de pneumonie après 18mois à Paris [21]. Il reste encore fréquent dans le tiers-monde et donne des atteintes pleuro pulmonaires sévères et difficiles à drainer.

-Mycoplasma pneumoniae :

C'est incontestablement la cause la plus fréquente des pneumonies de l'enfant de plus de 2 ans dans les pays occidentaux. La fréquence est sous-évaluée car l'infection n'est pas suffisamment recherchée [5, 22, 23, 24]. Toutes les études ont bien montrée que les infections à Mycoplasme sont rare avant 2 ans : c'est une infection du grand enfant et de l'adolescent.

Les infections respiratoires à mycoplasmes atteignent surtout l'enfant et l'adulte jeune et surviennent surtout en automne et en hiver.

-Moraxella catarrhalis :

Le rôle de ce germe, assez fréquent dans les infections respiratoires hautes, est diversement apprécié dans les infections respiratoires basses.

Chlamydia trachomatis : est à l'origine de pneumopathies sévères de la période néonatale, par transmission maternelle au moment de l'accouchement. Un germe dont l'importance est sous-estimé en pédiatrie [25].

-Chlamydia pneumoniae :

Est à l'origine de 3 à 7% des pneumonies du grand enfant en Europe, ce chiffre atteignant plus de 20% dans une étude américaine récente [24].

2.4. Rappels des tableaux cliniques :

2.4.1. La bronchopneumonie [26]

De début brutal, elle se manifeste par une forte fièvre irrégulière, associée aux signes suivants : les troubles digestifs, une altération de l'état général, la cyanose des lèvres et des ongles, un choc avec tachycardie hypotension et un trouble de la conscience.

On observe des signes nets de détresse respiratoire qui sont : la polypnée et le battement des ailes du nez.

Un foyer de condensation pulmonaire est souvent objective à l'auscultation avec diminution du mur mure vésiculaire, des râles bronchiques et crépitants témoignent d'un foyer aigu bactérien.

La radiographie pulmonaire de face objective un foyer non systématisé bien limité.

L'évolution est rapidement favorable en quelques jours.

2.4.2. **Pneumonie franche lobaire aiguë** «pneumonies systématisées» [27].

C'est l'atteinte d'un lobe (pneumonie lobaire) ou d'un segment pulmonaire (pneumonie segmentaire ou lobulaire), avec alvéolite fibrinoleucocytaire. La pneumonie lobaire ou « franche » est fréquemment causée par le pneumocoque.

Etiologie : Le pneumocoque (*Streptococcus pneumoniae*) est l'agent responsable d'environ 50% des pneumopathies communautaires.

Le pneumocoque est un germe Gram positif, lancéolé, entouré d'une capsule. On le trouve dans la flore des voies aériennes chez 25% des sujets normaux (porteurs « sains »). Il en existe environ 80 sérotypes : chez l'enfant, les types 6, 14, 19, et 23 sont les plus pathogènes et, chez l'adulte, les types 1 – 9 et 12.

La transmission se fait généralement par inhalation.

La pneumonie se développe en général chez des sujets dont l'immunité générale ou locale est momentanément diminuée : infection à virus des voies aériennes, inhalation d'air pollué, exposition au froid, insuffisance cardiaque, maladies cachectisantes, aspiration de mucosités oropharyngées dans les voies aériennes.

-Anatomie pathologique : La pneumonie à pneumocoque a une prédilection pour la base des poumons. Elle est lobaire ou segmentaire, parfois bilatérale.

. Stade de congestion : hyperhémie intense, distension des capillaires, exsudation alvéolaire.

. Stade d'hépatisation rouge : Le poumon prend l'aspect macroscopique du foie. Les alvéoles sont remplies de fibrine qui englobe dans ses mailles de nombreux polynucléaires et des globules rouges. Les alvéoles contiennent de nombreux pneumocoques.

. Stade d'hépatisation grise : Le poumon prend une teinte grisâtre. La surface de section laisse échapper un liquide purulent. Des macrophages

pénètrent dans les alvéoles. Les leucocytes et les hématies qui s'y trouvent se désintègrent.

. Stade de résolution : le poumon devient gélatineux. Les alvéoles ne contiennent plus que des débris cellulaires.

-Symptômes :

Signes fonctionnels : souvent précédée par une infection banale des voies aériennes supérieures, la pneumonie à pneumocoques commence sur le mode aigu par un frisson (inconstant), une fièvre à 39-40°C, des douleurs thoraciques et un pouls accéléré le malade devient dyspnéique, parfois cyanosé et recouvert de sueurs abondantes. Un herpès labial ou de la face est observé dans la moitié des cas. Des troubles digestifs (météorisme, nausées) sont fréquents. La pneumonie des lobes inférieurs peut parfois simuler un abdomen aigu. Les enfants ont parfois des convulsions. Chez les sujets affaiblis, le début de la pneumonie peut être atypique et insidieux. La douleur thoracique est presque constante. Elle est localisée du côté atteint. La toux, d'abord sèche, ramène après 1-2 jour des expectorations ambrées, rouillées, visqueuses, adhérentes au crachoir.

-Signes physiques : pendant les premières heures, on constate une tachypnée et une diminution de l'ampliation respiratoire du côté atteint. Une submatité ou une matité apparaît ensuite sur la plage atteinte, avec augmentation des vibrations vocales, présence de fins râles crépitants, souffle tubaire, pectoriloquie. Un frottement pleural est fréquemment présent pendant quelques heures. Au cours de la résolution, les râles deviennent moins nombreux et sous crépitants. La matité et le souffle s'effacent.

Complications :

Septicémie et Choc septique.

Complication pulmonaire.

- Extension de la pneumonie à plusieurs lobes, pouvant aboutir au choc toxique et à l'insuffisance respiratoire aiguë.
- Atélectasie segmentaire ou lobaire : elle peut survenir dans le décours de la pneumonie. Massive, elle peut causer un accès de dyspnée, accompagnée de cyanose, de tachycardie et d'angoisse. Elle est causée par des bouchons

mucopurulents qui se détachent sous l'effet d'une kinésithérapie respiratoire. L'aspiration endothoracique peut être nécessaire.

- Abscess pulmonaire : complication rare de la pneumonie à pneumocoques.
- pneumonie chronique : résolution très lente. Parfois le lobe atteint subit une transformation fibreuse et perd toute fonction (carnification).

- **Complications intra thoraciques.**

-Epanchement para pneumonique : un petit épanchement est fréquent. Il est d'habitude stérile et se résorbe rapidement, mais dans certains cas il faut recourir aux agents fibrinolytiques ou, en cas d'échec, à une thoracoscopie ou une thoracotomie.

-Empyème : il survient en générale pendant le décours de la pneumonie, même chez des malades correctement traités par les antibiotiques. Il faut évoquer ce diagnostic lorsque la fièvre, les douleurs thoraciques et l'épanchement persistent. Le diagnostic de certitude est fourni par la ponction pleurale qui ramène un liquide purulent.

-Péricardite purulente : complication rare accompagnant en général l'empyème. Elle se manifeste par des douleurs précordiales, un frottement péricardique et par un ECG et un échocardiogramme caractéristiques.

- **Complications extra pulmonaires :**

On les voit surtout chez l'enfant. On observe des otites moyennes, des mastoïdites, des mono arthrites, des méningites et des péritonites. L'endocardite est rare.

EXAMENS DE LABORATOIRE :

- l'examen cytobactériologique des expectorations montre le plus souvent de nombreux germes associés accompagnés de leucocytes et d'hématies. Il n'a d'insert que s'il existe une prédominance nette de pneumocoques (diplocoque Gram positif, lancéolés, en courtes chaînettes).
- Recherche des antigènes solubles du pneumocoque par contre immunoélectrophorèse.
- Hyperleucocytose habituelles (15 000 à 25 000 leucocytes/ μ l). La leucopénie est un indice de gravité (signe d'une mauvaise défense).
- Hémoculture positive dans 30 des graves.

RADIOLOGIE :

Tout au début, la radiographie du thorax peut être normale ou ne montre qu'une opacité floue et peu dense progressant des hiles vers la périphérie. Plus tard, apparaît une condensation lobaire ou segmentaire ; l'atteinte pluri lobaire est un signe de gravité. La présence de liquide dans le sinus costodiaphragmatique est fréquente. Les anomalies radiologiques peuvent persister pendant 10-18 semaines.

CRITERES DE GRAVITE

- enfant < 1 an ou sujet âgé > 65 ans.
- pathologie associée (p. ex. BPCO, diabète, cardiopathie, cirrhose, immunodépression, splénectomie fonctionnelle).
- température > 40°C.
- polypnée.
- hémocultures positives.
- sérotype 3 et 8.
- leucocytes < 5000/ μ l ou > 30 000/ μ l.
- Hématocrite < 30%. Hémoglobine < 9 g/dl.
- Créatinémies > 25mg/l.
- tension artérielle systolique < 90mmhg.
- Radiologie : atteinte pluri lobaire.
- Complications.

DIAGNOSTIC :

Début brutal, avec signes fonctionnels respiratoires et fièvre élevée apparus en moins de 48 heures, s'accompagnant à l'auscultation des signes d'une atteinte parenchymateuse localisée (râles crépitants voir souffle tubaire), toux, crachats rouillés contenant des pneumocoques, condensation lobaire ou segmentaire (radiographie).

Diagnostic différentiel : dans les pneumonies à germes atypiques, les signes fonctionnels et généraux sont généralement plus discrets, plus progressifs et les signes physiques, absents, plus discrets avec fréquemment une note bronchique.

Sa mortalité globale est au tour de 8 – 10%. Pour les pneumonies pneumococciques en réanimation la mortalité est de 20%.

2.4.3. **Pneumonie à staphylocoque**

Etiologie :

Staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*). La fréquence de la pneumonie à Staphylocoque, qui est d'environ 2% des pneumonies communautaires, augmente lors des épidémies de grippe. La maladie frappe souvent les sujets débilisés, immunodéprimés, hospitalisés ou soumis à une ventilation assistée prolongée. Elle s'observe en particulier chez les drogués par voie veineuse, précédée d'une septicémie à Staphylocoques. Cette forme étiologique de pneumonie peut se compliquer rapidement d'épanchement pleural, de pleurésie purulente (empyème), d'abcès pulmonaire, de pneumothorax.

-Symptômes :

Evolution rapide, parfois fulminante, ou lente, avec formation plus fréquente d'un empyème.

Examens de laboratoire :

Les expectorations contiennent d'innombrables coques Gram positif, souvent intracellulaires. Les hémocultures sont positives dans 30% des cas. L'antibiogramme est très important pour la conduite du traitement.

Radiologie : La radiographie du thorax montre une ou plusieurs plages de condensation, en général non lobaire ou segmentaires. La présence des cavités, contenant parfois un niveau liquide, est typique.

2.4.4. **Pneumonie à streptocoques**

Etiologie : en général Streptocoques β -hémolytique du groupe A.

Symptômes : la pneumonie à Streptocoques peut compliquer la grippe, la rougeole, la scarlatine et l'angine. La symptomatologie est celle de la pneumonie à pneumocoques. Un épanchement pleural, habituellement infecté, s'observe dans la moitié des cas.

L'évolution peut cependant être sévère et l'empyème est une complication relativement fréquente. (Mortalité faible)

2.4.5. **Pneumonies à germes Gram négatif :**

Etiologie : *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyannique), *Pseudomonas pseudomallei*, espèces de *Proteus*, *Bacteroides*, *Escherichia coli* (colibacille).

2.4.5.1. **La pneumonie à *Haemophilus influenzae* :** (bacille de Pfeiffer) atteint surtout les enfants au tour d'un an d'âge, est souvent précédée d'une rhinite et peut s'accompagner d'une septicémie. Les souches contenant une capsule polysaccharidique de type b ou « Hib » sont particulièrement virulentes.

2.4.5.2. **La pneumonie à *Klebsiella pneumoniae* :** (bacille de Friedländer) se signale par des expectorations très visqueuses, rosées. La condensation pulmonaire est souvent localisée au lobe supérieur, très dense et forme une ligne concave dans sa partie inférieure.

2.4.5.3. **La pneumonie à *Bacteroides* :** se développe après fréquemment chirurgie abdominale ou pelvienne. Elle est en général grave.

2.4.5.4. ***Pseudomonas pseudomallei* :** (agent de la mélioïdose, observé en zone subtropicale et tropicale) cause des pneumonies allant des formes latentes, aux formes subaiguës ou chroniques. Il y a des formes foudroyantes. (Mortalité 30-40%)

2.4.5.5. **La pneumonie à légionella :**

Synonyme : légionellose

Etiologie : *Légionella pneumophila* est un bacille aérobique, Gram négatif, ubiquitaire en milieu aquatique. Il vit en symbiose avec les amibes dans le bio film qui recouvre l'intérieur des tuyaux et des réservoirs contenant de l'eau entre 25°C et 42°C. Il a été reconnu en 1976 comme agent pathogène et tire son nom de la convention de la légion américaine où un certain nombre de personnes réunies dans un hôtel de Philadelphie furent infectées. L'infection est contractée par l'inhalation des bacilles propagés dans l'air par les climatiseurs, les humidificateurs, les nébulisations, les vaporisateurs, les circuits d'eau chaude, notamment dans les hôtels et les hôpitaux. Les dispositifs permettant d'évacuer la chaleur produite par les systèmes de climatisation, dits tours aéroréfrigérantes, installés à l'extérieur des

bâtiments, sont fréquemment colonisés. Le sérotype LP1 reste le principal agent étiologique. La transmission interhumaine n'a pas été confirmée.

Facteurs favorisants : tabagisme, broncho-pneumopathie obstructive, alcoolisme, corticothérapie. Chez le sujet immunodéprimé, l'infection peut provoquer un syndrome clinique grave avec défaillance multi viscérale et atteinte neurologique. Contrairement aux autres patients ayant une immunodépression cellulaire, la légionellose est peu fréquente chez le patient infecté par le VIH.

Symptômes : La maladie du légionnaire, qui représente environ 4% des pneumonies nosocomiales, provoque des signes de pneumopathie aiguë, myalgies, fièvre élevée avec frisson ($\frac{3}{4}$ des cas) ou en plateau autour de 40°C, toux avec expectorations rares, douleur thoraciques, dyspnée, cyanose, bradycardie relative. Râles crépitants et humides. Symptômes digestifs et parfois altération de l'état mental.

La fièvre de Pontiac est une infection de type grippal, avec fièvre, frisson, myalgie, sans pneumonie, dont l'évolution est bénigne.

Examens de laboratoire :

Recherche des antigènes solubles dans les urines par méthode ELISA ou par agglutination rapide au latex qui donne des résultats en moins de vingt-quatre heures.

La recherche des germes par culture des premières expectorations.

-immunofluorescence directe de l'exsudat : positive dans 50% des cas.

Sérodiagnostic : recherche d'anticorps dans 2 sérums successifs. L'élévation du titre des anticorps (de 1/16 à 1/128) survient vers la 3^e semaine. Test spécifique, mais peu utile en pratique.

Hyperleucocytose modérée habituelle.

Tests hépatiques souvent perturbés (élévation des transaminases).

Hypo natrémie : fréquente.

Radiologie : la radiographie du thorax montre des condensations lobaires ou bilobaires, avec épanchement pleural dans 25% des cas.

Complications :

- complications pulmonaires : abcès du poumon, empyème, pneumopathie interstitielle chronique.
- Complications cardiaques : endocardite, péricardite, myocardite.
- Autres complications : abcès hépatique, pyélonéphrite, rhabdomyolyse, troubles neurologiques (confusion, amnésie rétrograde pour la durée de la maladie, aphasie, ataxie, polynévrite). La mortalité est de 10-15% des cas sporadiques et 30% des sujets immunodéprimés.

2.4.5.6. Pneumonie à *Chlamydia pneumoniae*:

Etiologie : *Chlamydia pneumoniae* ou « agent de Taiwan » est une bactérie Gram négatif à développement intracellulaire obligatoire qui cause une infection respiratoire. La transmission est directe par les gouttelettes respiratoires. Contrairement à la Psittacose, causée par *C. trachomatis*, la transmission de *C. pneumoniae* n'est pas liée aux oiseaux.

La prévalence de l'infection asymptomatique chez les personnes de plus de 60 ans dépasserait 70%. On estime que 6 à 19% des pneumopathies communautaires de l'adulte sont causées par ce germe.

Symptômes : Le tableau clinique est celui d'une pneumonie « atypique » avec une période d'incubation de 7-21 jours ; parfois on observe une pharyngite aiguë, une sinusite, une bronchite ou une poussée d'asthme.

Examens de laboratoire : L'identification du germe est possible par culture sur œufs embryonnés ou par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.4.5.7. Pneumonie à mycoplasmes :

Synonymes : maladie d'Eaton, pneumonie à agglutinines froides.

Etiologie : L'agent pathogène est *Mycoplasma pneumoniae* transmis par contact direct (inhalation de gouttelettes émises par les sujets infectés).

Epidémiologie : Elles sont observées souvent dans une communauté (elle est souvent citée comme seconde cause de pneumopathie communautaire chez le sujet sain après le pneumocoque). Les formes graves et les infections du système nerveux central surviennent chez les sujets âgés ou immunodéprimés.

Anatomie pathologique : les pneumonies à mycoplasmes (comme celles à virus, à rickettsies, à chlamydiae) se caractérisent par l'absence d'exsudat

alvéolaire et par une inflammation interstitielle aiguë avec infiltration des zones péribronchiques par plasmocytes et des petits lymphocytes.

Symptômes : Après une période d'incubation de 10 à 15 jours, début insidieux par un syndrome grippal, une pharyngite ou une trachéobronchite avec toux sèche, souvent incoercible, insomnante et résistante aux traitements symptomatiques habituels. Parfois expectoration mucopurulente ou striée de sang. La dyspnée est fréquente, liée plutôt au bronchospasme associé qu'à l'étendue de la pneumopathie. L'évolution vers la pneumonie est possible avec signes auscultatoires absents ou minimes (quelques râles crépitants). Ces symptômes régressent progressivement, mais un état de fatigue persiste longtemps. Les infections à mycoplasmes peuvent intéresser la sphère ORL (rhinites, pharyngites, sinusites, otites) ou se manifestent par des myocardites, méningites, anémie hémolytiques, myalgies, arthralgies.

Examens de laboratoire

- Culture du *Mycoplasme pneumoniae* : le germe peut être mis en évidence dans les expectorations, mais les cultures sont lentes (1-2 semaines) et difficiles.
- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).
- Réactions sérologiques.
- Réaction de fixation du complément.
- Test ELISA.
- Hémogramme : normal ou hyperleucocytose modérée, parfois lymphopénie.
- Vitesse de sédimentation : accélérée.

Radiologie :

Opacités atypiques, peu denses, progressant à partir des hiles, uniques ou multiples, unilatérales ou bilatérales. On note une prédilection pour les bases. Effacement radiologique en 2-3 semaines. Petit épanchement pleural dans 10 à 20% des cas. Epanchement massif rare.

Complications (rares) : otites moyennes, érythème multiforme (syndrome de Stevens Johnson), syndrome de Reynaud, anémie hémolytique. Hépatite, arthrite, myocardite, péricardite, polynévrite, syndrome de Guillain Barré, syndrome de détresse respiratoire aiguë de l'adulte.

Diagnostic : L'apparition chez un adulte jeune d'une trachéobronchite avec opacités interstitielles et agglutinines froides évoque la pneumonie à mycoplasmes.

Diagnostic différentiel : celui des pneumonies à virus, à rickettsies, à *Chlamydiae* et à *légionella*.

En conclusion, les pneumopathies communautaires peuvent être prises en charge en ambulatoire. La radiographie thoracique est indispensable, les autres examens dépendent du contexte. L'attitude thérapeutique dépend avant tout de l'épidémiologie régionale et de l'âge de l'enfant.

2.4.6. STRATEGIE THERAPEUTIQUE DEVANT UNE PNEUMOPATHIE COMMUNAUTAIRE.

2.4.6.1 QUAND HOSPITALISER ?

L'hospitalisation est rarement nécessaire. Elle doit être demandée en cas de détresse respiratoire, de pneumopathie lobaire chez un enfant de moins de 1 an, un épanchement pleural, une pneumatocele, des troubles hémodynamiques, une déshydratation associée, une absence de réponse favorable sous une antibiothérapie bien conduite, un milieu social précaire, un terrain particulier (drépanocytose, diabète, encéphalopathie et myopathes [28]).

2.4.6.2 QUELLE ANTIBIOTHERAPIE ?

L'**ABSTENTION THERAPEUTIQUE** est parfaitement justifiée s'il existe une forte suspicion d'infection virale sans surinfection bactérienne évidente. Cependant la surinfection bactérienne peut survenir rapidement, en particulier chez le jeune nourrisson. Si on décide de surseoir au traitement antibiotique, il faut attentivement suivre le malade et réévaluer systématiquement la situation 24 à 48 heures après le premier examen pour rechercher une éventuelle surinfection bactérienne nécessitant un traitement. De toute façon cette décision n'entraîne pas une abstention thérapeutique : elle est surtout logique en cas d'absence de pneumonie radiologiquement évidente.

L'antibiothérapie va être conditionnée par l'agent causal.

Comparer les différentes études est difficile car les méthodes sont variables [22-29]. Cependant, il semble important de définir une épidémiologie

régionale : la fréquence des germes et leur résistance aux antibiotiques varient selon les régions et les latitudes ce qui explique la variabilité des consensus thérapeutiques en fonction des régions. [30]. Mais, si la répartition des bactéries change entre pays développés et en développement, les causes virales sont proches.

2.4.6.3 **Pneumocoque**

Il est important d'isoler le germe (hémoculture, expectoration, ponction pleurale) pour disposer de l'antibiogramme en raison de la fréquence croissante des résistances à la pénicilline. Les pneumocoques à haut niveau de résistance à la pénicilline (CMI \geq 2mg /l) sont fréquents dans les méningites et les otites mais sont plus rares dans les pneumonies de l'enfant. Si le pneumocoque a une sensibilité intermédiaire à la pénicilline (CMI entre 0,1 et 2mg /l), l'apyrexie est rapidement obtenue avec les betalactamines [31, 30,32]. Amoxicilline 100mg/kg/j + (acide clavulanique) si $<$ 2 ans,

Si échec après 48 h donner du Macrolide 50mg/kg/j pendant 15 jours.

2.4.6.4. **Haemophilus influenzae type b**

Un aspect important est l'émergence de souches productrices de betalactamase, qui obligent à utiliser un antibiotique adapté. On utilise habituellement l'un des antibiotiques suivants : cotrimoxazole, doxycycline, ampicilline, Amoxicilline + acide clavulanique, céfuroxime ou céfaclor.

2.4.6.5 **QUELS TRAITEMENTS EN DEHORS DE L'ANTIBIOTHERAPIE ?** **[26]**

2.4.6.5.1. **Kinésithérapie respiratoire :**

Il faut la débiter à la phase sécrétante de la pneumopathie pour une durée de 6 séances, l'accélération du flux expiratoire semble la méthode de référence. Elle augmente la clairance du mucus. Malheureusement il n'existe pas d'études évaluant l'action de la kinésithérapie. Mais il semble évident qu'un jeune enfant dont la toux est peu efficace va bénéficier de ce drainage.

2.4.6.5.2. **Fluidifiants bronchiques :**

IL s'agit des mucolytiques vrais (Fluimicil®, Mucolator®, Mucomyst®, Mucofluid®) et mucorégulateurs (Bronchokod®, Muciclar®, Rhinathiol®).

Bien que leur prescription soit fréquente aucune étude pédiatrique n'a montré leur intérêt dans ce contexte et il n'existe aucune étude de pharmacocinétique chez l'enfant.

La prescription de ces produits n'est donc pas justifiée dans les pneumopathies communautaires de l'enfant [33].

2.4.6.5.3 **Anti inflammatoires :**

La corticothérapie est proposée en cas de pneumopathie avec atélectasie d'un lobe ou d'un segment sans que cette attitude ait été évaluée par des études randomisées et contrôlées.

Stratégies antibiotiques (fig. 2)

- RAISONS DU CHOIX.

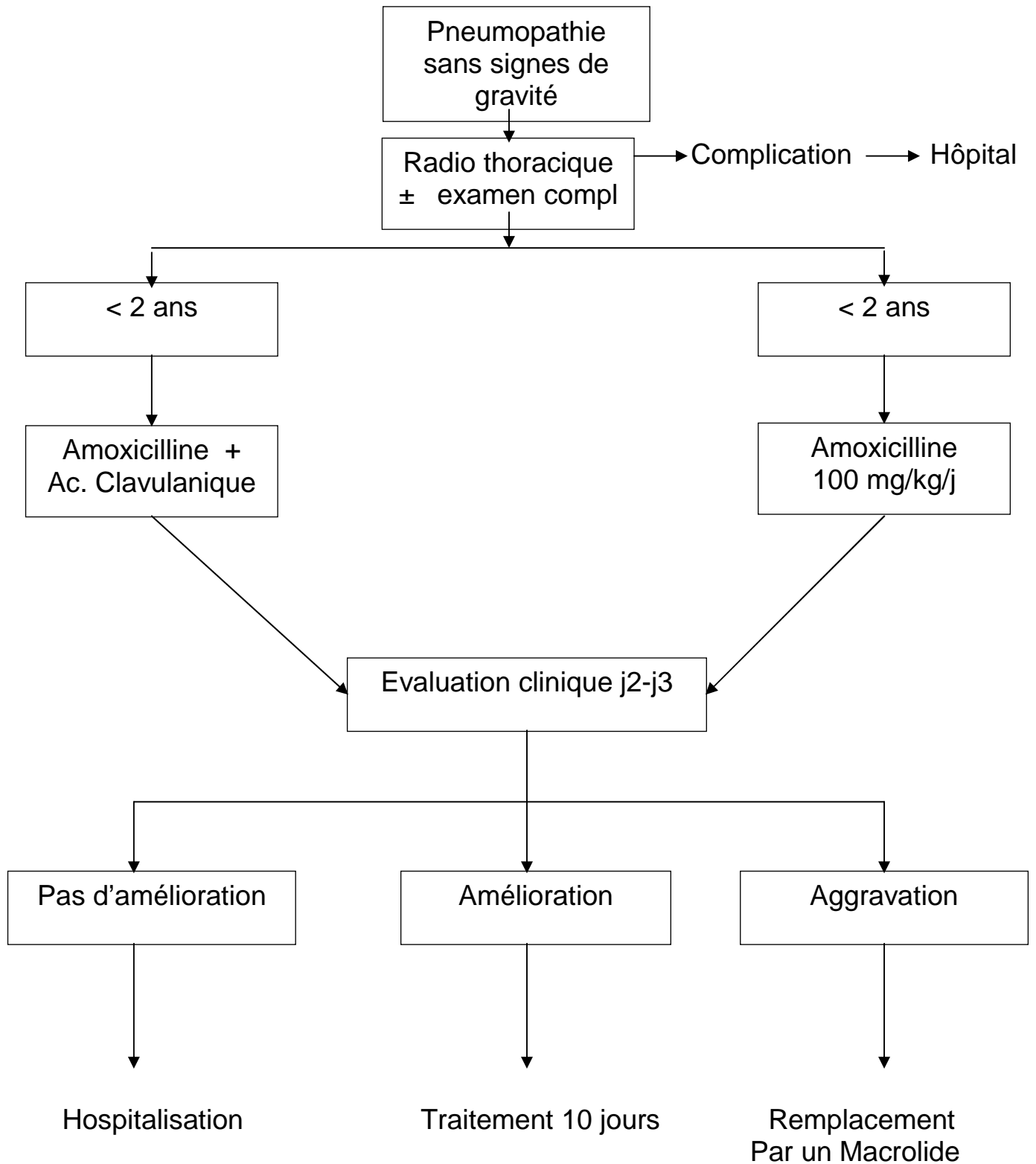
Dans les pays industrialisés, l'importance des infections à pneumocoques varie d'un pays à l'autre. Compte tenu de la répartition très différente des résistances bactériennes, il importe de définir une véritable épidémiologie régionale des causes bactériennes de pneumonies et des résistances des germes : c'est le seul moyen de diriger une antibiothérapie probabiliste.

Dans les pays développés où les mycoplasmes constituent la première cause de pneumonies chez l'enfant de plus de deux ans, la logique voudrait que le traitement de première intention soit les macrolides, toujours actifs sur ce germe. En fait, il importe de raisonner en fonction de la gravité du tableau clinique plus qu'en fonction des causes les plus fréquentes. Les pneumonies à pneumocoque sont plus graves que les pneumonies à mycoplasmes. Fréquemment génératrices d'hypoxie, elles mettent en danger la vie la vie de l'enfant : dans la série de Saint -Vincent de Paul, 92% des pneumonies à pneumocoques avaient dû être hospitalisées contre 36% des pneumonies à mycoplasmes.

Les différentes enquêtes montrent bien qu'il est difficile d'obtenir d'emblée par la clinique ou le cliché de thorax des arguments définitifs pour l'un ou l'autre germe. Dans ces conditions, il importe de choisir en première intention un antibiotique actif contre les pneumocoques en raison de leur gravité. L'Amoxicilline ou la pénicilline entraînent une apyrexie rapide, en moins de 24 heures quand le pneumocoque est sensible. Plusieurs séries ont bien montré que de fortes doses d'Amoxicilline sont actif in vivo sur les

pneumocoques de résistance intermédiaire (CMI de 0,1 à 2mg/l) à la pénicilline : l'emploi d'une dose de 100mg/kg d'Amoxicilline permet alors d'obtenir une guérison de la pneumonie [29-32]. Surtout, des études récentes ont bien prouvé que la mortalité est due à la sévérité de l'atteinte pneumococcique initiale : la mortalité par pneumonie est la même, que le pneumocoque soit résistant ou sensible sur à la pénicilline [32].

En fin les pneumocoques ayant un haut niveau de résistance à la pénicilline peuvent provoquer des pneumonies graves d'emblée chez le jeune nourrisson. Mais, plus souvent ils surinfectent des atteintes virales ou malformatives, entraînant des infections traînantes et fébriles, et la cause est prouvée par la fibroscopie bronchique qui permet un prélèvement [34].



Figurel : Arbre décisionnel devant une pneumonie de l'enfant. [5]

Enfant de plus de 2 ans :

L'antibiotique de choix est l'Amoxicilline à dose suffisante (80 à 100 mg/kg/j) en raison de sa bonne biodisponibilité. Les *Haemophilus* sont très rares à cet âge, et il est indispensable de choisir en première intention un antibiotique actif rapidement sur les pneumocoques, y compris ceux dont la sensibilité à la pénicilline est diminuée (c'est la raison des fortes doses).

En cas d'échec clinique des betalactamases (fièvre persistante et non régression des signes respiratoires pendant plus de 48 heures), le diagnostic le plus probable est celui d'une pneumonie à mycoplasme et un macrolide doit être prescrit. Le traitement doit être au moins de 10 à 15 jours, en cas d'infection confirmée à mycoplasme.

Jeune nourrisson (âge inférieur à 2 ans) :

A cet âge on ne peut éliminer, malgré les progrès de la vaccination, un *Haemophilus*. D'autre part, c'est à cet âge que le nombre de pneumocoques à haut niveau de résistance à la pénicilline sont les plus fréquents (15% contre 7% après 2 ans pour Cohen et Geslin). Il importe donc dans le traitement probabiliste d'agir sur les deux germes. Le meilleur choix est donc l'association d'Amoxicilline et d'acide clavulanique à condition d'utiliser une dose de 100mg/kg d'Amoxicilline, ce qui permet un traitement per os.

L'augmentation des résistances de l'*Haemophilus* au cotrimoxazole et son action assez faible sur les pneumocoques font que ce médicament voit son rôle assez réduite dans les infections respiratoires basses en France.

Cette attitude n'est qu'indicative et surtout elle n'est valable que pour la France où l'importance des infections à mycoplasme après 2 ans et des infections à pneumocoques et à *Haemophilus* chez le jeune enfant la justifie. Mais il en va autrement dans d'autres régions où l'épidémiologie est différente.

TABLEAU I: ARGUMENTS DIFFERENTIELS ENTRE PNEUMOPATHIES BACTERIENNES ET VIRALES [18].

	Origine bactérienne	Origine virale
Mode de début	Rapide	Progressif
Etat général	Aspect toxique Troubles hémodynamiques	Conservé
Signes cliniques	Toux productive Signes en foyer	Toux sèche
Signes associés	Météorisme abdominal	Myalgie Eruption Poly adénopathie
Radiographie	Signes en foyer	Distension Images interstitielles
Hémogramme	GB > 20000/mm ³	GB < 20000/mm ³
Moyens diagnostiques	Culture bactérienne + hémoculture, Liquide pleural, porte d'entrée, sécrétions bronchiques Ag solubles +	Immunofluorescence + Sécrétion pharyngées, liquide pleural Ascension x 4 titres Ac

NB : Ces arguments sont tout à fait schématiques ; le plus souvent, aucune donnée clinique, biologique ou radiologique ne permettra de trancher.

METHODOLOGIE

3-METHODOLOGIE :

3.1. Cadre et lieu d'étude :

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

- 2 hottes à flux laminaire avec incinérateur électrique pour la stérilisation des anses
- 3 automates d'hémocultures Bactec 9050 ;
- 1 incubateur multifonctionnel pour les bactéries aéro- anaérobies ;
- 1 incubateur sans CO₂.
- 1 centrifugeuse ;
- 2 congélateur à - 80 °C pour la conservation des souches bactériennes
- 1 congélateur à - 20 °C pour la conservation des disques d'antibiotiques,
- 2 réfrigérateurs 2 à 8 C pour la conservation des milieux de culture et des réactifs ;
- 1 microscope Olympus CX31
- Des ordinateurs avec un système de communication Internet ;
- 1 néphelomètre Mc Farland pour les mesures de turbidité en vue des antibiogrammes conformément à la méthode de KIRBY BAUER ;

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

Le personnel comprend :

- un pharmacien biologiste ;
- trois (3) pharmaciens ;
- des internes ;

- deux (2) assistants de biologie ;
- des techniciens supérieurs ;
- un personnel de surface.

3.2. **Type d'étude :**

Il s'agit d'une étude transversale prospective sur un an, basée sur la recherche de bactéries responsables de pneumonie chez les enfants dans le service de pédiatrie au CHU Gabriel TOURE.

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

Dans certains cas, et selon le contexte clinique, un examen cytot bactériologique du crachat induit est réalisé.

3.3 **Durée de l'étude**

L'étude a été réalisée sur une période d'un an : de décembre 2012 à novembre 2013 couvrant les trois saisons : saison sèche, saison chaude, saison pluvieuse.

3.4 **Critères d'inclusion et de non - inclusion**

3.4.1 **Critères d'inclusion**

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

- être admis à l'hôpital
- Répondre aux critères cliniques de l'OMS pour la pneumonie sévère ou très sévère à l'admission.
- Age compris entre 28 jours et 59 mois
- Obtenir le consentement éclairé écrit des parents /tuteur
- Vivre dans la zone de recrutement définie par l'étude (peut être définie comme toute une zone ou partie d'une zone géopolitique par rapport à l'hôpital)

3.4.2 **Critères de non- inclusion:**

- Avoir une pneumonie contractée à l'hôpital, définie comme pour une raison quelconque au cours des 14 derniers jours.
- Une période d'un mois (30 jours) de non inclusion après la date de sortie d'hôpital pour une admission pour laquelle l'enfant a été inscrit dans l'étude.

➤ **Collecte de données :**

Les variables que nous avons utilisées ont été collectées par :

-Interrogatoire :

L'Age, le sexe, la résidence qui constitue les données sociodémographiques ont été collectés sur la base d'interrogation réalisée par l'équipe du CVD au service de pédiatrie.

3.5. DESCRIPTION DE LA METHODE :

L'appareil "Bactec 9050 de chez Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, Md." et d'autres automates d'hémoculture comme le "BacT- ALERT 3D Combination de chez bioMérieux", utilisent des méthodes de détection des flacons positifs basées sur différentes mesures du CO₂. Les microorganismes présents dans les bouteilles Bactec libèrent du CO₂ qui réagit avec un colorant présent dans le capteur de l'appareil. Ceci module la quantité de lumière qui est absorbée par un composant fluorescent du capteur. Les détecteurs photosensibles de l'instrument mesurent l'intensité de la fluorescence, laquelle correspond à la quantité de CO₂ libérée par les microorganismes. La mesure est ensuite interprétée par le système en fonction des paramètres de positivités pré-programmés.

Le système "BacT- ALERT 3D Combination" fonctionne grâce à une technologie colorimétrique développée par bioMérieux, la croissance des microorganismes dans chaque flacon est constamment surveillée par un réflectomètre très sensible. Tout changement de statut des flacons est enregistré par un signal sonore et visuel comme pour le Bactec.

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

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

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

Il existe 5 types de flacons Bactec :

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

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

3.5.1. **PROTOCOLE DE TECHNIQUE DES HEMOCULTURES POSITIVES**

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

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

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

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

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

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

- Le service de pédiatrie est informé d'un résultat positif de la coloration de Gram
- Si des *cocci* Gram positif en paires ou en chaînettes sont observés, un disque de Bacitracine (A) ainsi qu'un disque d'Optochine (P) sont déposés sur la gélose au sang de la subculture ;
- Les boîtes contenant les subcultures sont mises dans l'incubateur à CO₂ à la température entre 35 à 37°C. Si la coloration de Gram est positive, la bouteille est incubée avec les boîtes ;
- Lorsqu'une croissance est observée, les références des boîtes dans lesquelles des colonies ont été observées, sont portées sur la fiche de travail ainsi que les résultats de la coloration de Gram effectués et l'aspect de chaque colonie bactérienne ;
- Si des *cocci* Gram positifs sont observés, nous nous référons à l'organigramme de travail. Il s'agit de :

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

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

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

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

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

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

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

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

- Si le micro-organisme est un bacille Gram positif, aucun test additionnel n'est effectué. Le micro-organisme est enregistré comme «Bacille Gram Positif » ;
- Si des bactéries Gram négatif sont observées, nous nous référons à l'organigramme suivant :

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

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

préliminaire indique *Neisseria meningitidis*, la confirmation est faite par un test de sérotypage ;

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

- Un antibiogramme est fait par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon KIRBY-BAUER ;
- Le résultat est enregistré dans le registre de laboratoire et le médecin du patient est informé de l'identification finale.

3.5.1.1. Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

3.5.1.1.1. Coloration de Gram

Principe :

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

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

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

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

Matériels et réactifs utilisés :

- microscope binoculaire avec objectifs 10 et 100 ;
- huile à immersion ;
- coffret de colorants de Gram contenant :
 - violet de gentiane ou cristal violet ;
 - solution de lugol ;
 - solution de décolorant alcool acétone ;

- safranine ou fuchsine basique ;
- lames porte-objet ;
- portoir de lame ;
- crayon de papier ;
- papier buvard ;
- flacon d'eau distillée ;
- bac de coloration.

Procédure de la coloration :

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

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

- La solution de safranine (ou la fuchsine basique) est mise sur le frottis pendant 60 secondes (2 fois plus longtemps que les autres étapes) ;
- La safranine est versée et la lame est rincée en la tenant sous un faible jet d'eau. Egoutter l'excès d'eau. Prudemment, la lame est séchée avec d'un papier buvard. Ne pas surtout frotter la lame pour la faire sécher.

Interprétation :

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

Par exemple :

Cocci Gram positif en grappes = *Staphylococcus*

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

Cocci Gram positif en chaînettes = *Streptococcus*.

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

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

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

Bacilles Gram positif = Plusieurs micro-organismes

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

Cocci Gram négatif en paires = *Neisseria*

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

Bacilles Gram négatif = Plusieurs micro-organismes

Note : Il existe plusieurs bacilles Gram négatif comprenant *Haemophilus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*.

3.5.1.1.2 **Tests biochimiques et métaboliques**

- **Observation de la réaction d'Hémolyse :**

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

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

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

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

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

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

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

3.5.1.1.3 **Catalase**

Principe :

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

Matériels et réactifs utilisés :

Peroxyde d'hydrogène à 3%

Lame de verre

Anse

Procédure :

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

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

Interprétation :

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

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

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

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

3.5.1.1.4 **Test à l'Optochine (disque P)**

Principe

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

Matériels et réactifs utilisés :

Disque d'Optochine (P)

Gélose au sang

Anse

Procédure :

- le micro-organisme est ensemencé sur une gélose au sang.

- dans l'espace où la croissance est la plus dense (c'est à dire la première partie de la boîte qui est inoculée), un disque d'Optochine est placé.

- la boîte est mise dans l'incubateur à CO₂.

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

Interprétation :

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

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

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

3.5.1.1.5 **Test de Sensibilité aux antibiotiques** : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon KIRBY-BAUER

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

Principe :

La méthode de diffusion des disques selon KIRBY-BAUER est basée sur l'observation qu'il y a une corrélation entre la concentration minimale inhibitrice (CMI) et le diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne autour d'un disque d'antibiotique. La taille de la zone d'inhibition de croissance est déterminée par la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique, la concentration du disque d'antibiotique, le taux de diffusion du disque d'antibiotique et le taux de croissance du micro-organisme. En standardisant les conditions du test (exemple : préparation

d'un seul antibiotique contenu dans le disque, milieu de culture spécial, atmosphère et durée d'incubation) et avec une concentration du micro-organisme du test, la zone d'inhibition mesurée sera corrélée avec la sensibilité du micro-organisme à l'antibiotique (exemple : plus la zone est grande, plus l'organisme est sensible).

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

Matériels et réactifs utilisés :

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

Conditions de stockage nécessaires :

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

Procédure du test :

- Les boîtes de gélose (TSH, CHOC et MAC Conkey) doivent être réchauffées à la température de la salle avant qu'elles ne soient

inoculées. Aucun excès d'humidité ne doit se trouver sur la surface de la gélose. La surface peut être humide mais des gouttelettes d'humidité ne devraient pas être présentes au moment d'inoculer la gélose avec le micro-organisme ;

- La gélose MHA-B (Mueller Hinton au sang) est utilisée pour *Streptococcus pneumoniae* et pour les autres tests ;
- Les disques pour le test de sensibilité sont enlevés du réfrigérateur afin de leur permettre de se réchauffer à la température de la salle, auparavant ils auront été enlevés du récipient de conservation. Il ne faut pas exposer les disques froids à l'air de la salle parce que la condensation de l'humidité sur les disques froids conduirait à une détérioration rapide des antibiotiques. Les dates d'expiration sont vérifiées sur les récipients des antibiotiques ; les disques périmés ne sont à pas utilise.
- Au moins 4 à 5 colonies bien isolées de même morphologie sur la gélose au sang sont sélectionnées. Ne pas sélectionner des colonies de la boîte de gélose de Mac Conkey. Le sommet de chaque colonie est touché avec une anse et les transférée dans un tube de solution saline. L'inoculum de la solution saline est ajusté à une turbidité égale à un standard de 0.5 de l'échelle de Mac Farland en utilisant le turbidimètre. Cette étape est très importante. La boîte de gélose est immédiatement inoculée avec l'inoculum ajusté ;
- Un écouvillon stérile trempé dans la suspension ajustée. L'écouvillon est tourné plusieurs fois sur la paroi intérieure du tube au-dessous du niveau du liquide pour enlever l'excès de l'inoculum. La surface entière de la boîte de gélose est inoculée en faisant tourner la boîte d'approximativement 60 °C et l'ensemencement est fait de nouveau. La boîte est tournée et l'ensemencement est répété jusqu'à trois fois pour s'assurer d'une distribution régulière de l'inoculum. A l'étape finale, le bord de la gélose est tamponné ;
- Une boîte gélose est inoculée pour *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et deux pour les autres bacilles Gram négatifs ;

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

Les applicateurs de disques d'antibiotiques sont souvent utilisés ;

Les disques d'antibiotiques suivants seront testés:

- a. Pour *Streptococcus pneumoniae* : Oxacilline 1 µg (pour le test de Pénicilline 10 UI), Tétracycline 30 µg, Erythromycine 15 µg, Chloramphénicol 30 µg ; Cotrimoxazol 1,25/23,75 µg.
- b. Pour *Staphylococcus aureus* : Pénicilline 10 UI, Gentamycine 10 µg ; Oxacilline 1 µg ; Ampicilline 10 µg, Tétracycline 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ; Ciprofloxacine 5 µg.
- c. Pour *Haemophilus influenzae* : Ampicilline 10 µg, Tétracycline 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ; Amoxicilline/Acide clavulanique 20/10 µg, Ciprofloxacine 5 µg ; Cotrimoxazol 1,25/23,75 µg.
- d. Pour les autres bacilles Gram négatif ;
- e. Boîte de gélose N°1- Ampicilline 10 µg, Ceftriaxone 30 µg, Chloramphénicol 30 µg ;
- f. Boîte de gélose N°2- Gentamicine 15 µg, Cotrimoxazole 25 µg, Ciprofloxacine 5 µg ;

Les espèces *Streptococcus* et *Haemophilus* sont placées dans l'incubateur à CO₂.

Tous les autres micro-organismes devraient être placés dans un incubateur en aérobiose.

Interprétation :

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

- Les diamètres de la zone d'inhibition complète du disque sont mesurés, au millimètre près, en utilisant une règle posée sur la face postérieure de la boîte. Les résultats d'Oxacilline de *Staphylococcus* sont interprétés en tenant la boîte face à la lumière afin que toute croissance puisse être mise en évidence. Toute croissance discernable dans la zone d'inhibition est indicatrice de la résistance à la Vancomycine ou à l'Oxacilline. Fréquemment ces colonies seront très petites ; alors il faudrait examiner les boîtes avec soins.
- La limite est l'aire dans laquelle une croissance évidente est visible à l'œil nu, exceptée la trace de la ligne de croissance à la lisière de la zone d'inhibition.
 - a. La croissance de larges colonies à l'intérieur d'une zone d'inhibition claire devrait indiquer un mélange de croissance. Si tel est le cas, alors la sensibilité est mixée, reprendre le test. Si les colonies persistent dans la zone, il faut les considérer comme significatives ;
 - b. Avec le Cotrimoxazole, les micro-organismes se développent au travers de plusieurs générations avant d'être inhibés. On ne tiendra pas compte de la faible croissance, on doit lire seulement les limites de la croissance en abondance ;
 - c. On se réfère à la grille de sensibilité des disques pour l'interprétation des tests.
 - d. Les tests du disque de Pénicilline pour *Streptococcus pneumoniae* ne sont pas exacts. C'est la raison pour laquelle le disque d'Oxacilline 1 µg est utilisé. Ne pas reporter les résultats comme Oxacilline mais plutôt les reporter comme Pénicilline.

Compte-rendu :

Les antibiotiques sont testés suivant les normes NLSI.

- Reporter les résultats dès que l'identification du micro-organisme est complète qui sont conservés dans le Trypticase soy-broth+15% de glycérol à 80 °C.
- Si le profil de sensibilité est atypique pour le micro-organisme identifié, l'identification et le test de sensibilité devraient être repris. Si les

résultats restent atypiques, ils pourraient être discutés avec le superviseur du laboratoire ou le directeur avant de les reporter ;

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

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

b. Si le *Staphylococcus* est résistant à l'Oxacilline, reporter Pénicilline et Céftriaxone et ainsi que les autres bêta-lactamines comme résistants sans tenir compte de ce que le test du disque indique.

Sérotypage des souches de *Streptococcus pneumoniae* :

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

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

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. L'intérêt de se référer à des souches standard est devenu si évident que des organisations nationales ou internationales se sont créées à cet effet. Leur but est le maintien en cultures pures des microorganismes tels que les levures, les champignons inférieurs, les bactéries, les rickettsies et les virus. L'une des plus célèbres est l'«American Type Culture Collection» (ATCC) située à Rockville aux Etats-Unis.

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

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

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

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

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

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

Eléments de l'assurance qualité :

Les procédures suivantes sont suivies :

- l'identification des spécimens ;
- l'enregistrement dans les registres de travail ;
- la saisie des résultats ;
- le contrôle de qualité consistant en :

Le suivi des appareils

Relevé des températures quotidiennes

On procède à un relevé quotidien de température :

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

Suivi du niveau d'eau de l'incubateur

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

Nettoyage des filtres

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

Contrôle de la turbidité de l'appareil Mc Farland

Le contrôle de la qualité des réactifs et milieux de cultures :

Les réactifs et les milieux de cultures sont contrôlés sur des souches de références qui sont conservés dans le Trypticase Soy-broth +15% de Glycerol à la température entre moins 60 à moins 90 °C :

- *Streptococcus pneumoniae* A T C C 49619 ;
- *Haemophilus para-influenzae* A T C C 7901 ;
- *Haemophilus influenzae* A T C C 49247 ;
- *Streptococcus* groupe B A T C C 12386 ;
- *Staphylococcus aureus* A T C C 25923 ;
- *Streptococcus* groupe A A T C C 19615 ;
- *Escherichia coli* A T C C 25922

Il s'agit :

- Des milieux de culture : gélose au sang de mouton ou de cheval, gélose Mac Conkey, Müeller Hinton, gélose chocolat, gélose trypticase soja.
- Des réactifs qui permettent la réalisation des techniques suivantes :

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

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

La périodicité de contrôle est spécifique au test donné. Le contrôle de qualité des réactifs, des milieux de cultures et les disques sont faites par semaine.

3.5.2. PROTOCOLE DE TRAITEMENT DE L'EXPECTORATION INDUITE AU LABORATOIRE :

a- objet/Contexte :

Le diagnostic de l'agent causal de la pneumonie n'est pas simple.

Les échantillons des voies respiratoires inférieures comme les expectorations et l'expectoration induite sont fréquemment contaminés par la flore oropharyngée et plusieurs organismes sont capables de portage ou de pathogénicité. Il peut être difficile de déterminer quel est l'agent pathogène parmi les nombreux organismes présents dans l'échantillon. L'évaluation des Gram est effectuée pour s'assurer que les échantillons de crachats trop contaminés sont identifiés, de prévoir le résultat de la culture et d'aider à l'interprétation des résultats de la culture. L'utilisation de cultures sélective et non sélective est nécessaire pour sélectionner d'éventuels agents pathogènes de la flore normale.

Les échantillons respiratoires doivent être transportés immédiatement au laboratoire car même un temps modéré à température ambiante peut entraîner la poussée de contaminants. Le stockage dans un réfrigérateur peut entraîner la perte d'agents infectieux sensibles à la température tel que *Streptococcus pneumoniae*.

L'objectif de ce SOP est de donner des orientations sur l'isolement et l'identification des organismes présents dans les échantillons respiratoires, en particulier les organismes suivants en tant que potentiels agents pathogènes de la pneumonie :

- *Streptococcus pneumoniae*

- *Haemophilus influenzae*
- *Beta-haemolytic Streptococci A, B, C or G*
- *Cryptococcus neoformans*
- *Moraxella catarrhalis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Cadre/Applicabilités :

Ce SOP est applicable a tout le personnel de laboratoire impliqué dans le traitement des échantillons au laboratoire.

b-Rôles/responsabilités :

[Site specific]

c- Echantillon :

Expectorations induite et expectoration

d-Pré-requis/matériels :

Equipements :

Incubateur 5% CO₂ à 37° C

Incubateur aerobique, ou 3,5L jar d'incubation et kit de generateur de gaz pour les laboratoires qui n'ont pas ces incubateurs.

Congélateur – 80° C

Congélateur – 20° C

1,5 micro litre- boites de culture steriles jetables

Microscope

Cabinet de biosecurité

Boite pour conserver les lames, identifiée en fonction des jours de la semaine.

e-Materiels :

Anse en platine

Flacons a vis pour congelation

Bec Bunsen

Huile a immersion

Lame microscopique

Anse sterile jetable

Pipette Pasteur sterile jetable

Gelose au sang

Gelose chocolat (Bacitracine sang chauffé)

Gelose Mac Conkey + cristal violet

10 IU bacitracin disques

f-Sécurité/Evaluation des risques :

Toutes les expectorations, expectoration induite, échantillon d'aspiration ou liquides respiratoires doivent être traités dans un cabinet biohazard.

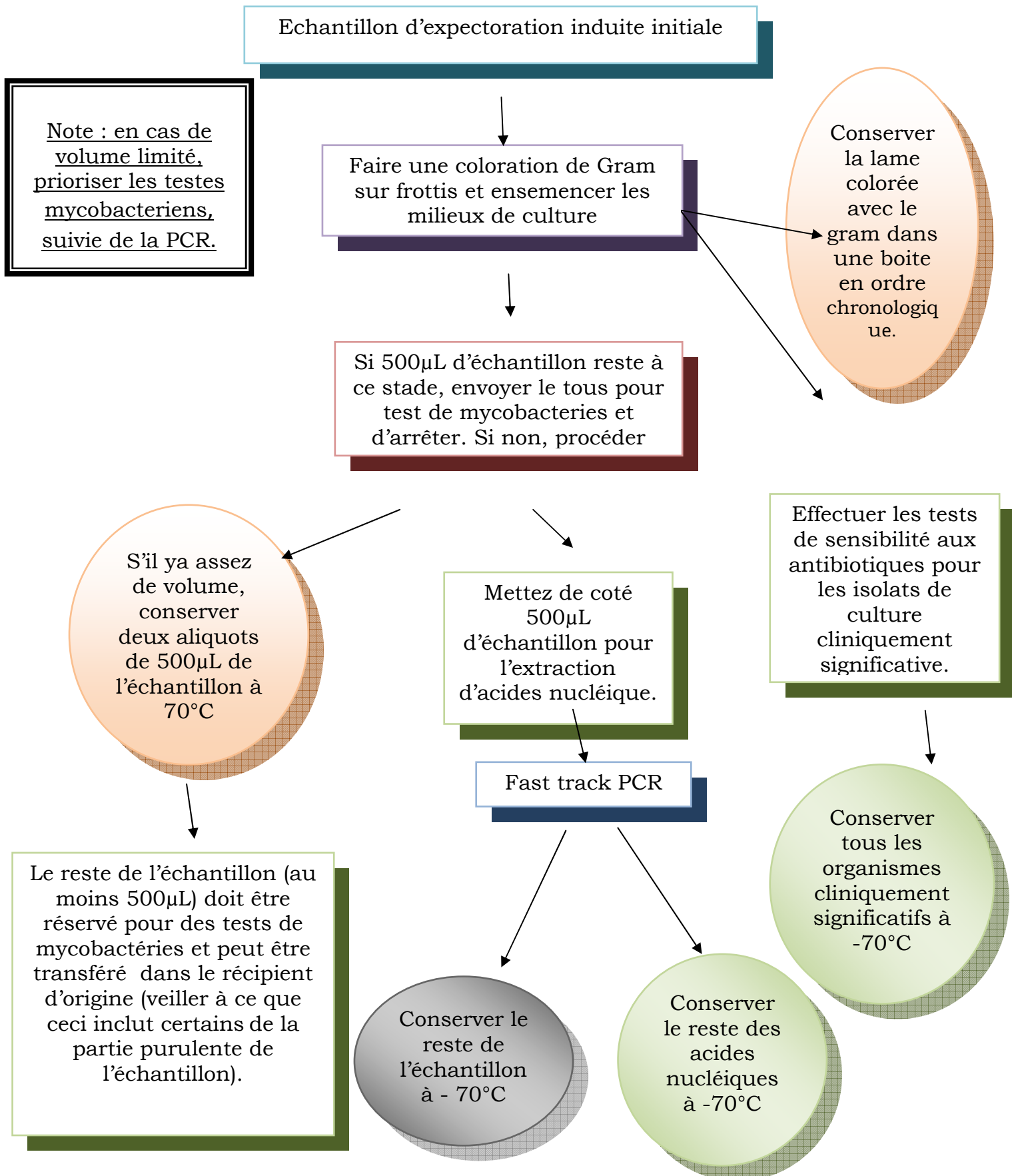
EPI approprié doit être porté par les techniciens de laboratoire.

g-Procédures :

Pré-traitement d'échantillon (manipulation)

Traiter l'échantillon immédiatement à l'arrivée au laboratoire. Si l'échantillon ne peut être traité immédiatement après prélèvement conserver à 4°C pour un maximum de 24 heures.

Traitement d'échantillon d'expectoration induite



Préparation des frottis et coloration de Gram :

En utilisant un écouvillon stérile, faire un frottis sur une lame de verre sec, propre identifiée en utilisant la portion la plus purulente de l'échantillon. Le frottis ne doit pas être si épais qu'il est difficile de lire après avoir été coloré, mais pas si mince au risque de perdre les agents pathogènes.

L'échantillon placé sur la lame à colorer est séché à l'air dans le cabinet de biosécurité et fixé ensuite à la chaleur.

Faire une coloration de Gram (Ref: SOP pertinent au site spécifique)

Utiliser le système de classement Bartlett pour évaluer la quantité de l'expectoration, en évaluant le nombre de cellules épithéliales squameuses et des neutrophiles représentée par champ à faible grossissement. Lire les résultats de coloration de Gram, d'observation à fort grossissement.

Le jour suivant comparez avec les résultats de culture. (faire référence annexe 1 and 2).

Ne pas rejeter les échantillons en raison du score Bartlett. Tous les échantillons doivent être mis en culture et les résultats sont enregistrés. Conserver les lames de coloration Gram dans de coloration dans une boîte à lames dans l'ordre chronologique (ne pas jeter).

Procédure de la culture :

Les échantillons respiratoires liquides doivent être traités dès que possible après le prélèvement.

S'assurer que tous les échantillons d'inoculation sont disponibles dans le cabinet de sécurité biologique; anse en plastique jetable, les milieux de culture nécessaires, lames, flacons d'aliquotage etc.

Choisissez les milieux appropriés (BA, MAC et CHO(or BHB)).

Les milieux à ensemercer doivent être étiquetés indiquant le numéro d'identification de l'échantillon (ID) et la date d'innoculation.

Ensemencer les milieux avec une goutte de l'expectoration induite ou liquide d'aspiration en utilisant la portion la plus purulente de l'échantillon et étaler en utilisant la méthode de quatre quadrants. Assurez-vous qu'une portion de la partie purulente est réservée pour la culture de la

recherche de Mycobactéries. il est important d'utiliser une méthode standardisée d'étalage parce que cela va aider a l'interpretation des résultats de la culture.

Utiliser toujours le milieu pour chaque échantillon.

Etaler selon le modèle figurant dans l'annexe 3, sans tourner l'anse.

Si la gelose chocolat est utilisé, placer un disque de 10 UI bacitracine sur le deuxième quadrant de la gelose chocolat. Cela empêche la plupart des OPF et améliore la détection de *Haemophilus Influenzae* (il n'est pas nécessaire de le faire si la gelose BHB est utilisé)

Pour les sites qui effectuent des testes pour le PCP, une déclaration est nécessaire et doit être inserée ici].

Après que la coloration de Gram est effectuée et les boites de culture ont été inoculées, faire aliquots suivants dans des boites steriles etiquetées:

Table 1

Aliquots d'échantillons		Priorité (en cas de Volume limité)
500 µL d'échantillon	Extraction d'acides nucléiques pour les tests PCR Fast Track (assurer que la partie purulente est incluse si c'est un échantillon purulent)	En cas de volume limité, priorité

500µL d'échantillon (deux aliquots de 500µL si le volume d'échantillon est Suffisant)	Stockage/testes futures	Mycobacteriens, ensuite les tests de PCR
Reste d'échantillon (au moins 500µL). Transférer l'échantillon dans le conteneur original plutôt que d'aliquoter.	Culture mycobacteriens et coloration (assurer qu'une partie purulente est incluse pour la culture mycobacteriennes s'il s'agit d'un spécimen purulent)	

Les boîtes de culture sont examinées à 24 heures et 48 heures.

NOTE : comparer les résultats de la coloration Gram aux résultats de la culture est une excellente méthode pour le suivi interne d'assurance qualité

EXAMEN DE LA CULTURE :

Jour 1

Examinez chaque milieu de culture pour une croissance importante, se référant à section 2.2 et 2.3

D'écrire, compter et enregistrer la morphologie des colonies, et quantifier les morphotypes différentes en fonction de leur répartition de croissance le long des lignes d'ensemencement par exemple une croissance limitée (scanty) sur la 1^{er} série de lignes, 1+ la croissance sur la 2^{ème} série de lignes, une croissance de 2+ dans la mesure de la 3^{ème} série de lignes croissance 3+ sur la 4^{ème} série de lignes (voir annexe 3). Purifier les organismes soupçonnés être importants.

Procéder à la coloration de Gram et l'identification et la sensibilité aux antibiotiques et des agents pathogènes importants selon le schéma de la Table 2.

Tableau 2 : Direction pour la notification des agents pathogènes dans les expectorations induites.

	Organisme(s)	Action n
a	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Toujours enregistrer et rapporter peu importe la quantité ou la prédominance. • Enregistrer et rapporter la quantité (maigres, 1+, 2+ ou 3+) • Travailler (identification, antibiogramme (sauf <i>cryptococcus</i>), et archiver (congeler)).
b	<i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> Autre β -haemolytic streptococci Unique morphotype de gram-negative bacilles* Tout autre organisme qui est predominant	<ul style="list-style-type: none"> • Pour une croissance mixte, enregistrer et rapporter que si $\geq 1+$ de croissance (soit 2^{ème} quadrant ou plus) pour une croissance pure enregistrer et rapporter n'importe la quantité. • Enregistrer et rapporter (1+, 2+ ou 3+) • Travailler (identification, antibiogramme qui sont prédominants sur OPF sur la coloration de gramme ou la culture.
c	Plus qu'un morphotype de gram-negative bacille (i.e.coliforms or <i>Pseudomonas</i> mixtes)	<ul style="list-style-type: none"> • Enregistrer et rapporter comme étant « mixte bacilles à Gram négatif » (code organisme MGNR) • Enregistrer et rapporter la quantité (scanty, 1+, 2+ ou 3+) • Ne pas travailler plus
d	Viridans streptococci Commensal <i>Neisseria</i> Coagulase-negative staphylococci Yeasts (sauf <i>Cryptococcus</i>) Diphtheroids <i>Capnocytophaga</i> Enterococci	<ul style="list-style-type: none"> • Enregistrer et rapporter comme une flore oropharyngée • Enregistrer et rapporter la quantité (maigre, 1+, 2+ ou 3+) comme un groupe. Il n'est pas nécessaire d'énumérer chaque organisme ou de donner les quantités individuelles • Ne pas travailler plus

*Y compris coliforms, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Burkholderia*.

En cas de doute s'il faut identifier ou signaler un isolat particulier, rapporter sa quantité relative sur la boîte originale, faire une boîte de pureté ou congeler, discuter avec un microbiogiste Cli/scientific senior. Tout organisme prédominant dans les expectorations, sauf ceux énumérés dans le groupe b dans le tableau 2, doit être considéré comme un pathogène potentiel, pas seulement les bactéries dans la section 2.2

Décrire la croissance mixte de bactéries pathogène respiratoires sans prédominance de potentiel pathogènes dans la coloration de Gram comme « flore oropharyngée » (OPF) scanty / 1+/2+/3+, en utilisant la zone de croissance maximale pour décrire la quantité.

S'il y a pas croissance après 24h, incuber à nouveau pendant 24h.

Comparer les boîtes de culture avec les expectorations d'origine ou frottis de liquide d'aspiration par la coloration de Gram.

Jour 2.

Examiner les milieux ré-incubés, si aucune croissance après 48 Heures reporter comme pas de croissance.

Observer et décrire la morphologie des colonies, la taille et la topographie des milieux ré-incubés et le milieu de pureté, s'il ya une croissance mixte.

Faire la coloration de Gram et l'identification à partir des milieux précédemment purifiés.

Effectuer les tests de sensibilité aux antibiotiques sur tous les organismes importants selon les directives du CLSI. (Ref#)

Une fois l'identification de l'organisme et la sensibilité aux antibiotiques ont été lues. Les résultats sont entrés dans la base de données. Enregistrer les grades Bartlett et le score total, la quantification à partir de la coloration de Gram de toutes les bactéries potentiellement pathogènes et la OPF, les résultats des tests de sensibilité pour les isolats pathogènes et les positions de tous les isolats congelés. Ne pas passez trop de temps à contrôler les isolats de *Streptococcus pneumonia* à la recherche de morphotypes différents, mais si il y a deux morphotypes très claires,

congeler un seul ou il existe clairement une prédominance. S'ils sont tous deux présents dans la même quantité et évidemment différents morphotypes, congeler les séparément.

Gestion des données :

Accès, Emplacement et la conservation des dossiers relatifs à la SOP spécifique au site.

Assurance Qualité/ Contrôle Qualité

La formation initiale et l'évaluation des compétences de tout le Personnel approprié dans ce SOP.

La formation de recyclage périodique et observation par le personnel de laboratoire.

Un sur dix (10%) des frottis de Gram seront examinés par un deuxième technicien principal/ scientifique.

La surveillance continue des reports.

3.5.3 Traitement informatique des données :

L'analyse des données a été faite avec le logiciel **SPSS 18.0**, le **Word** et l'**Excel** version 2010 ont servi de support pour la saisie des données.

3.5.4 Aspects éthiques :

3.5.4.1. Consentement des malades :

Des assistants de recherche sont formés à la méthodologie de l'étude, Particulièrement à l'obtention du consentement éclairé et à l'inclusion du malade dans l'étude.

Ils travaillent en collaboration avec le tri et les salles de consultations du service de Pédiatrie du CHU Gabriel TOURE pendant la durée de l'étude.

Chaque pédiatre est accompagné d'un assistant de recherche qui est chargé de vérifier les critères d'inclusion, d'expliquer les modalités de l'étude, objectifs, risques et bénéfices pour l'enfant à la famille et/ou au malade et d'obtenir le consentement éclairé du patient avant l'inclusion. Les parents sont approchés dès l'admission ou plus tard dans les 12 heures qui suivent celle-ci.

Après avoir obtenu le consentement du malade ou des parents le malade est inclus par l'assistant de recherche dans l'étude.

Cependant, si un enfant extrémis est incapable de donner un consentement éclairé, le consentement des parents suffit pour participer. Toute information que vous fournissez est gardée de Façon **confidentielle** dans des armoires bouclées, bien que les résultats de la culture soient donnés à votre médecin traitant. Nous, nous engageons à ne pas utiliser les échantillons de sang prélevés pour d'autres recherches, cependant certaines souches de pathogènes pourront être gardées pour des investigations futures.

3.5.4.2. Inconvénients potentiels de cette étude :

Le risque pour les enfants qui participent est faible. Tous les participants sont soumis à une ponction de sang veineux pour l'hémoculture. Cette procédure peut avoir un risque mineur dont la douleur, l'infection et l'hémorragie. A l'admission, beaucoup d'enfants vont subir une ponction sur indication du pédiatre et cette prise complémentaire peut avoir des risques. La procédure d'obtention d'autres liquides stériles d'autres sites (lombaire,

pleural, articulaire, tissulaire et osseux) peut avoir des risques comme la douleur, l'infection et la détérioration tissulaire. Ces procédures sont réalisées à la discrétion du médecin traitant et ne sont pas dictées par ce protocole. La culture de ces liquides, qui est prise en charge par l'étude, n'entraîne pas de risque additionnel.

3.5.4.3. Bénéfices :

Sur le plan individuel, les nouveaux équipements en place avec un personnel qualifié permettront une recherche étiologique avancée, telle l'isolement des bactéries par culture, non habituellement utilisées au CHU Gabriel TOURE. Ceci aide, considérablement, le médecin traitant à conduire un traitement étiologique, guidée par un antibiogramme, de la maladie de l'enfant, ce qui est largement important par rapport aux risques mineurs ci-dessus évoqués. Tous les examens biologiques (hémocultures et autres cultures, et antibiogrammes) ont été faits gratuitement chez les malades inclus.

D'une manière générale, cette étude va permettre de relever le niveau, la qualité des prestations au CNAM et au CHU Gabriel TOURE par l'amélioration du plateau technique (rénovation des locaux, équipements de laboratoire et de bureau).

Au terme de l'étude, l'épidémiologie des maladies concernées est mieux connue et des recommandations sont faites en vue d'améliorer leur prise en charge et pour permettre d'autres études dans le domaine de la vaccinologie (introduction de nouveaux vaccins).

Chronologie des activités :

De décembre 2012 à Mars 2013 : Revue de la littérature

De mars 2013 à Juin 2013 : élaboration et validation du protocole

De septembre à Novembre 2013 : Saisie et analyse des données,

De novembre 2013 à Mars 2014 : Rédaction finale.

RESULTATS

4- RESULTATS :

4.1. Présentation des résultats :

Au cours de notre étude 275 enfants ont été inclus dans le protocole des malades externes du CVD- MALI dans le service de Pédiatrie du CHU Gabriel Touré.

Les 275 enfants ont bénéficié tous d'une hémoculture et d'une expectoration induite à l'admission.

Sur les 275 hémocultures 235 étaient stériles soit 85,45%(235/275) des cas et 40 sont sorties positives soit 14,55%(40/275).

Parmi les 275 expectorations induites 274 contenaient des germes soit 99,63%(274/275) et 1 seul échantillon est sorti culture stérile soit 0,36%(1/275).

Pour l'hémoculture nous avons recensé 20 cas de pneumonies bactériennes confirmées soit une fréquence de 7,27% (20/275).

4.2. Description des résultats :

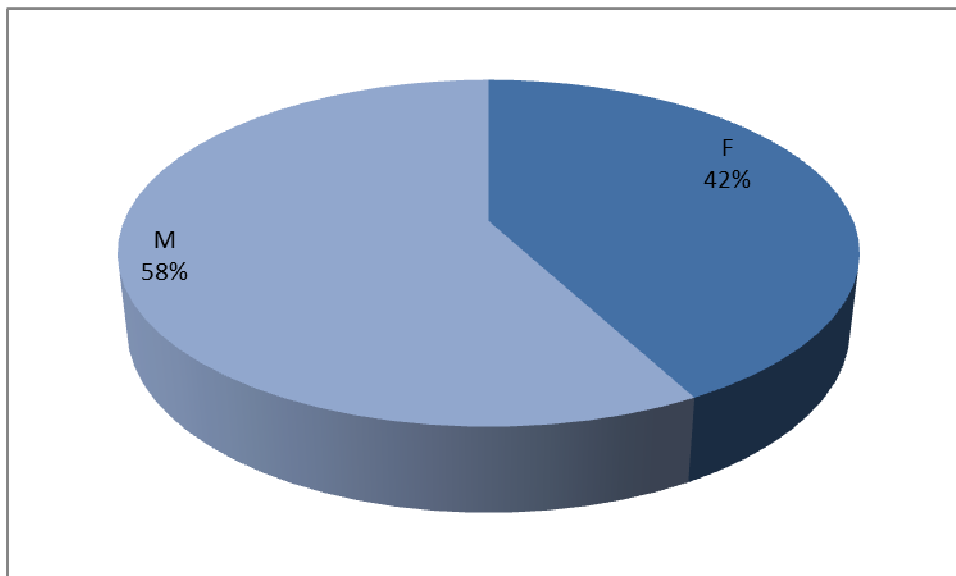


FIGURE II : Répartition des patients selon le sexe

Le sexe masculin était prédominant (58%) avec un sexe ratio de 1,38.

TABLEAU III : Répartition des patients selon la tranche d'âge

AGE /mois	EFFECTIF	POUCENTAGE
0 - 11	207	75,27%
12 - 23	52	18,91%
24 - 35	12	4,36%
36 - 59	4	1,45%
Total	275	100,00%

La tranche d'âge (0-11) mois était la plus représentée avec 75,27%.

TABLEAU IV : Répartition des patients selon la Résidence

RESIDENCE	EFFECTIF	POURCENTAGE
Commune I	64	23,27%
Commune II	32	11,64%
Commune III	27	9,82%
Commune IV	41	14,91%
Commune V	56	20,36%
Commune VI	55	20,00%
Total	275	100,00%

La majorité des patients venait de la commune I, V et VI du district de Bamako respectivement 23,27 ; 20,36 et 20% des patients.

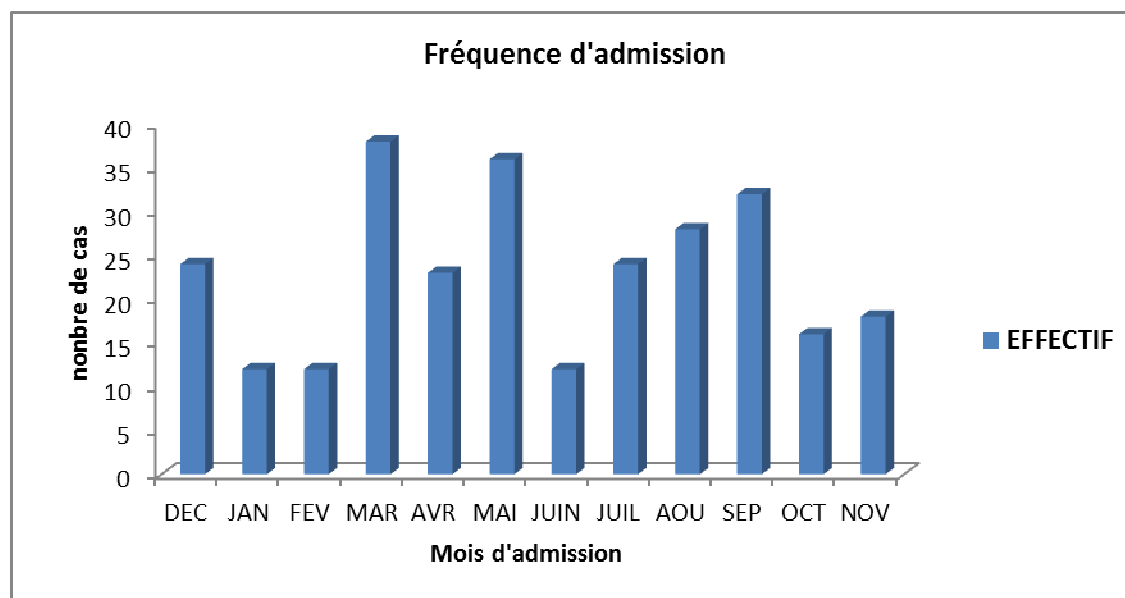


FIGURE III : Répartition des patients selon la période d'admission

C'est surtout aux mois de Mars, Mai et Septembre que nous avons enregistré le plus grand nombre de cas respectivement : 38, 36, et 32 cas.

TABLEAU V : Prévalence des bactéries isolées dans les hémocultures de décembre 2012 à novembre 2013.

GERMES ISOLES	EFFECTIF	POURCENTAGE
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11	47,83
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	4	17,40
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	8,69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	8,69
<i>Salmonella</i> Groupe D	2	8,69
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	4,35
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	4,35
TOTAL	23	100

Streptococcus pneumoniae (**47,83%**), *Haemophilus influenzae* (**17,40%**) *Staphylococcus aureus* (**8,69%**) et *Pseudomonas aeruginonosa* (**8,69%**) étaient majoritaire dans les hémocultures.

Les **17** autres bactéries concernaient les contaminants dont **12** *Staphylococcus non aureus* et **5** bacilles positifs.

TABLEAU VI: Prévalence des bactéries isolées dans les expectorations induites de décembre 2012 à novembre 2013.

GERMES ISOLEES	EFFECTIF	POURCENTAGE
<i>Haemophilus influenzae</i> spp	108	29,50
<i>Haemophilus influenzae</i> type b	12	3,28
<i>Moraxella catarrhalis</i>	88	24,05
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	53	14,48
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	13,66
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24	6,56
<i>Escherichia coli</i>	15	4,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	1,36
AUTRES	11	3,00
TOTAL	366	100

Haemophilus influenzae (**29,50%**), *Moraxella catarrhalis* (**24,05 %**), *Streptococcus pneumoniae* (**14,48 %**) et *Staphylococcus aureus* (**13,66%**) étaient majoritaires dans les expectorations induites.

AUTRES :

- Neisseria meningitidis* (0,27%),
- Haemophilus para influenzae* (0,27)
- Klebsiella oxytoca* (0,27)
- Pseudomonas fluorescens* (0,27),
- Salmonella Groupe D*(0,27),
- Acinetobacter anitratus* (0,27),
- Acinetobacter baumannii* (0,27)
- Acinetobacter calcoaceticus* (1,09%).

TABLEAU VII : Prévalence de principales bactéries isolées dans les hémocultures en fonction du sexe

Germes	Masculin		Féminin		Total	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6	46,2	5	50	11	47,82
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	2	15,4	2	20	4	17,39
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	7,7	1	10	2	8,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	7,7	1	10	2	8,70
Autres	3	23,1	1	10	4	17,39
Total	13	100	10	100	23	100

Le sexe Féminin a été prédominant pour l'infection à pneumocoque soit **50%**

TABLEAU VIII : Prévalence des principales bactéries isolées dans les hémocultures en fonction de la tranche d'âge

Germes	0-11 mois		12-23mois		24-35mois		36-59mois		Total	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	38,5	5	71,43	0	0	1	100	11	47,83
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	3	23,07	1	14,28	0	0	0	0	4	17,39
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	15,38	0	0	0	0	0	0	2	8,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	7,69	0	0	1	50	0	0	2	8,70
Autres	2	15,38	1	14,28	1	50	0	0	4	17,39
Total	13	100	7	100	2	100	1	100	23	100

La majorité des patients était infecté par *Streptococcus pneumoniae* soit **71,43%** et avait une tranche d'âge **(12-23) mois**.

TABLEAU IX : Prévalence des principales bactéries isolées dans les hémocultures en fonction de la résidence

Germes	CI		CII		CIII		CIV		CV		CVI		Total	
	E	P	E	P	E	F	E	P	E	P	E	P	E	P
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	28,57	0	0	2	66,67	1	50	2	66,67	4	57,14	11	47,82
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	42,86	0	0	0	0	1	50	0	0	0	0	4	17,39
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	1	100	0	0	0	0	0	0	1	14,28	2	8,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	14,28	0	0	0	0	0	0	1	33,33	0	0	2	8,70
Autres	1	14,28	0	0	1	33,33	0	0	0	0	2	28,57	4	17,39
Total	7	100	1	100	3	100	2	100	3	100	7	100	23	100

La Commune (CIII) a été majoritaire pour l'infection à pneumocoque **66,67%** tandis que la Commune (CI) a été prédominant pour l'infection à *Haemophilus influenzae* type b soit **42,86**.

TABLEAU X: Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction du sexe

Germes	Masculin		Féminin		Total	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	26	12,32	27	17,42	53	14,48
<i>Haemophilus influenzae typeb</i>	71	33,65	49	31,62	120	32,78
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	14,69	19	12,23	50	13,66
<i>Moraxella catarrhalis</i>	51	24,17	37	23,87	88	24,04
Autres	32	15,16	23	14,84	55	15,03
Total	211	100	155	100	366	100

Le sexe féminin a été majoritaire pour l'infection à pneumocoque avec **17,42%** tandis que le sexe masculin a été prédominant pour l'infection à *Haemophilus influenzae* **33,65%**.

TABLEAU XI : Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction de la tranche d'âge

Germes	0-11mois		12-23mois		24-35mois		36-59mois		Total	
	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%	Eff	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	41	17,29	8	10,13	3	8,33	1	7,14	53	14,48
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	83	35,02	25	31,65	10	27,78	2	14,28	120	32,78
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	10,55	13	16,45	9	25	3	21,43	50	13,66
<i>Moraxella catarrhalis</i>	61	25,74	20	25,32	5	13,89	2	14,28	88	24,04
Autres	27	11,39	13	16,45	9	25	6	42,86	55	15,03
Total	237	100	79	100	36	100	14	100	366	100

La tranche d'âge **0-11 mois** a été la plus infectée pour l'infection à

Haemophilus influenzae soit **35,02%**.

TABLEAU XII : Prévalence des principales bactéries isolées dans les expectorations induites en fonction de la résidence

Germes	CI		CII		CIII		CIV		CV		CVI		Total	
	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%	E	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11	11,11	6	13,95	7	17,5	7	13,46	11	17,74	11	15,71	53	14,48
<i>Haemophilus influenzae</i>	30	30,30	18	41,86	15	37,5	16	30,77	19	30,65	22	31,43	120	32,78
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	15,15	5	11,63	4	10	8	15,38	10	16,13	8	11,43	50	13,66
<i>Moraxella catarrharis</i>	21	21,21	12	27,91	9	22,5	13	25	15	24,19	18	25,71	88	24,04
Autres	22	22,22	2	4,65	5	12,5	8	15,38	7	11,29	11	15,71	55	15,03
Total	99	100	43	100	40	100	52	100	62	100	70	100	366	100

La communes **V** a été prédominant pour l'infection à pneumocoque soit **17,74%**.

La commune **VI** commune a la plus infectée pour l'infection à *Haemophilus influenzae* soit **31,43%**.

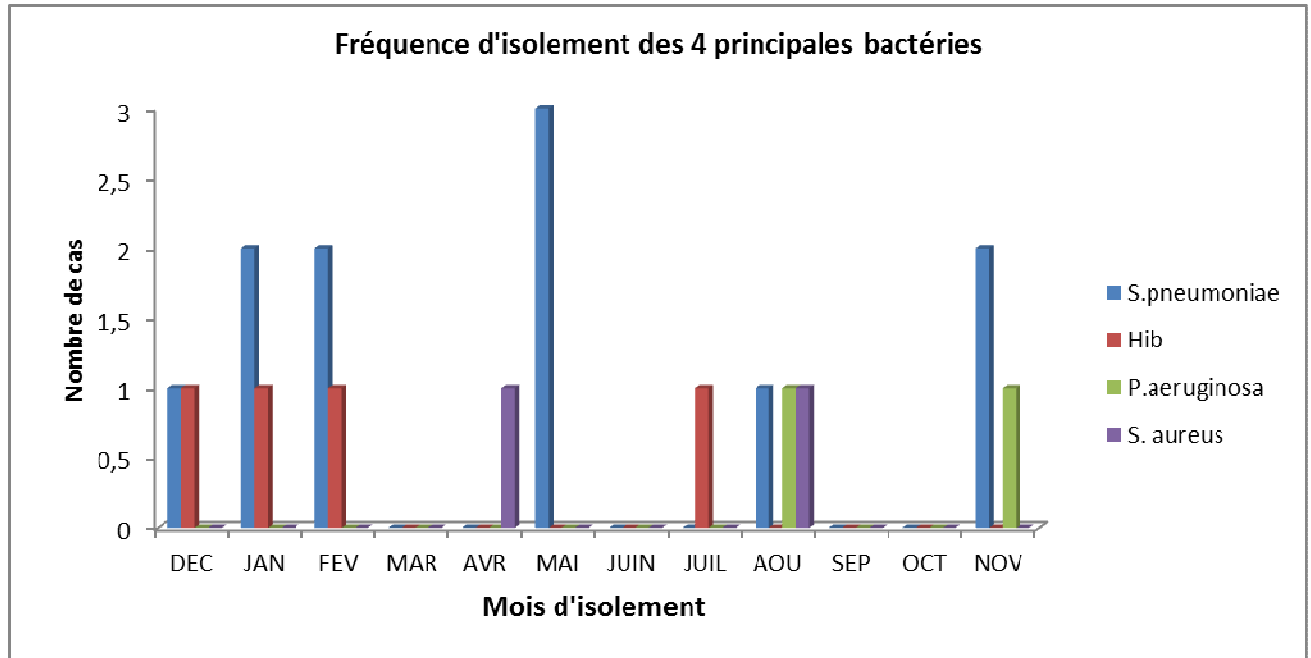


FIGURE IV: Répartition des 4 principales bactéries isolées dans les hémocultures pendant les Mois de la période d'étude.

Le mois de Mai a été le pic de l'incidence pour le pneumocoque.

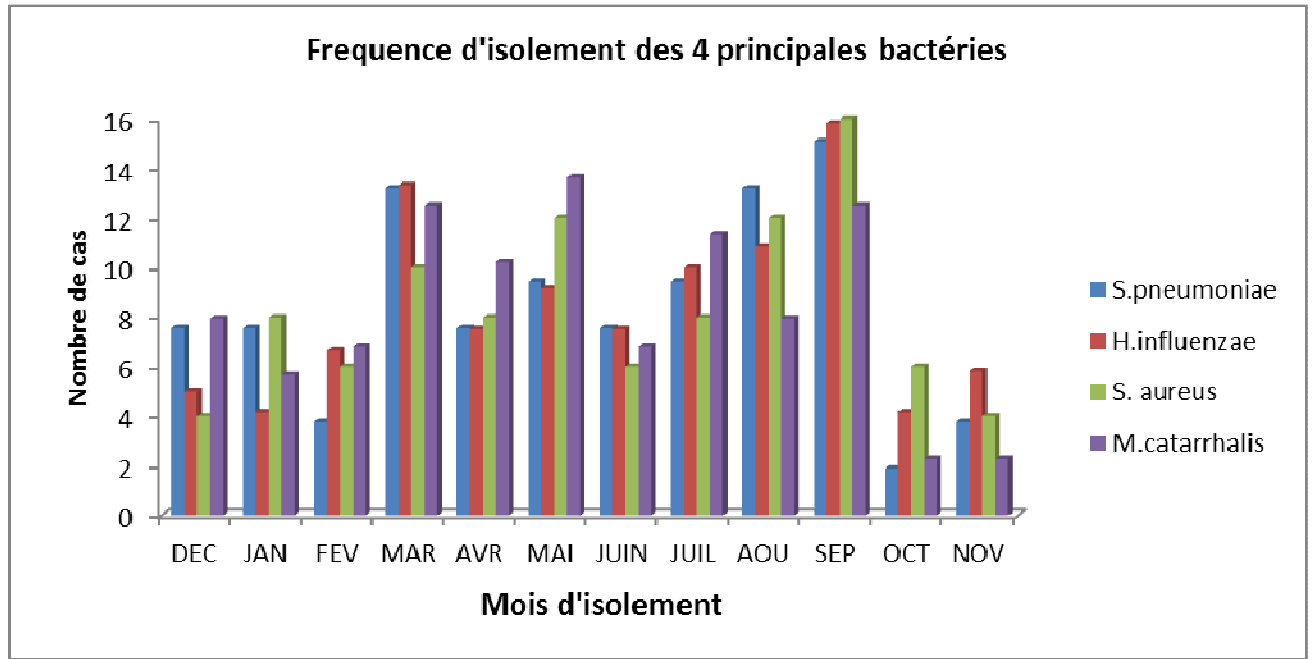


FIGURE V : Répartition des 4 principales bactéries isolées dans les expectorations induites pendant les Mois de la période d'étude.

Les Pics observés sont les mois de Mars, Mai, Août et Septembre.

-Profil antibiotique des souches responsables de pneumonie au cours de la période d'étude :

-Dans les hémocultures :

TABLEAU XIII: Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques (n=11souches)

Chlora		Cotri		Tetra		Oxa		Ery	
n	S %	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%
8	72,72%	3	27,28%	1	9,10%	10	90,90%	11	100%

n=nombre de fois de sensibilité à l'antibiotique.

S%= Pourcentage de sensibilité à l'antibiotique.

Chlora= Chloramphénicol, Cotri= Cotrimoxazol, Tétra= Tétracycline, Oxa=Oxacilline, Ery= Erythromycine.

Les souches (11/11) étaient sensibles aux antibiotiques suivants :

100% de sensibilité à l'érythromycine, 90,90%(10/11) à l'oxacilline et 72,72%(8/11) de sensibilité au Chloramphénicol. Par ailleurs nous avons obtenues un faible pourcentage de sensibilité au Cotrimoxazole et à la tétracycline respectivement 27,28%(3/11) et 9,10%(1/11).

TABLEAU XIV : Sensibilité du Hib aux antibiotiques (n= 4 souches)

Chlora		Cotri		Cipro		Ampi		Tetra		Amoxi/Clav	
n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%
3	75%	2	50%	4	100%	3	75%	0	0%	3	75%

Cipro= Ciprofloxacine, Ampi= Ampicilline, Amoxi/Clav= Amoxicilline +Acide clavulanique.

Les souches étaient sensibles à 100% à la Ciprofloxacine et à l'association l'Amoxicilline acide clavulanique, 75%(3/4) à l'Ampicilline et au Chloramphénicol et résistant à la tétracycline.

Le test de cefinase s'est révélé négatif dans tous les cas et par conséquent les souches sont sensibles à l'ampicilline.

TABLEAU XV : Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques (n=2 souches)

Cipro		Cefotaxime		Imipenème		Gentamycine	
n	S %	n	S%	n	S%	n	S%
2	100%	1	50%	2	100%	2	100%

Cipro=Ciprofloxacin

Sur **2 souches** testées nous avons observés les résultats suivants 100% de sensibilités à la ciprofloxacin, à l'imipenème et à la Gentamycine. 50% de sensibilité au Cefotaxime soit une résistance de 50%.

-Dans les expectorations induites :

TABLEAU XVI : Sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques (n=50 Souches)

Chlora		Cotri		Tetra		Oxa		Ery	
n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%
49	92,45%	27	50,94%	19	35,85%	39	73,58%	48	90,56%

Les souches du pneumocoque restent préférentiellement sensibles au chloramphénicol à 92, 45%(49/53), à l'érythromycine 90,56%(48/53), à l'oxacilline 73,58%(39/53) et au Cotrimoxazol 50,94%(27/53) . Nous avons constatés un faible pourcentage de sensibilité de 35,85%(19/53) pour la tétracycline.

TABLEAU XVII : Sensibilité de l' *Haemophilus influenzae* (n=120 souches)

Ampi		Amoxi/clav		Chlora		Cipro		Cotri		tetra	
n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%
90	75%	76	63,33%	92	76,33%	120	100%	10	8,33%	3	2,5%

Les souches d'*Haemophilus influenzae* ont été préférentiellement sensibles aux antibiotiques suivants : la Ciprofloxacine à 100%, le Chloramphénicol à 76,33%(92/120), l'ampicilline à 75%(90/120) et l'association Amoxicilline +acide clavulanique à 63,33%. Par ailleurs nous avons obtenus un faible pourcentage de sensibilité au Cotrimoxazole et à la tétracycline respectivement 8,33%(10/120) et 2,5%(3/120). Le test de Cefinase s'est révélé 5 fois positif sur 120 (5/120) soit un taux de positivité de 4,16%.

TABLEAU XVIII : Sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques (n=50 souches)

Genta		chloram		Cipro		Ery		Cotri		Peni G		Oxa		tetra	
n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%	n	S%
49	98%	48	96%	49	98%	42	84%	44	50%	6	12%	45	90%	10	20%

Genta=Gentamycine, Peni G= Penicilline G

Les souches de *Staphylococcus aureus* étaient sensibles à 98%(49/50) à la ciprofloxacine et à la gentamycine, au chloramphénicol à 96% (48/50) et une sensible à l'oxacilline 90% (45/50), au Cotrimoxazol 88%(44/50) et à l'érythromycine 84% (42/50). Nous avons observés un faible pourcentage de

sensibilité à la tétracycline, à la pénicilline G respectivement 12%(6/50) et 20%(10/50).

Moraxella catarrhalis: ne respecte pas la diffusion des disques d'antibiotique par la méthode de Kurby- Bauer.

C'est le test de betalactamase qu'on utilise et qui s'est révélé positive dans tous les cas et par conséquent résistant à l'ampicilline. **(n=85 souches)**

Ampicilline	Effectif	Pourcentage
Résistants	85	100
Sensibles	0	0

Moraxella catarrhalis était résistant à l'ampicilline.

R=nombre de fois de Résistance

S%= Pourcentage de Sensibilité.

Ampi= Ampicilline

TABLEAU XIX: Répartition des Patients selon le devenir

ETAT	EFFECTIF	POURCENTAGE
Amélioré	237	86,18%
Non amélioré	8	2,91%
Décédé	10	3,64%
Perdue de vue	20	7,27%
TOTAL	275	100%

La majeure partie de nos patients ont eu une amélioration de leur infection selon les signes cliniques après traitement soit 86,18%.

TABLEAU XX : Répartition des patients selon la tranche d'âge et le devenir

DEVENIR IMMEDIAT	0 -11mois		12- 23mois		24-35mois		36-59mois		TOTAL
	EFF	%	EFF	%	EFF	%	EFF	%	
AMELIRIORE	158	86,82	55	82,1	15	88,24	9	100	237
NON AMELIORE	6	3,29	1	1,49	1	5,88	0	0	8
DECEDE	6	3,29	4	5,97	0	0	0	0	10
PERDUE DE VUE	12	6,60	7	10,45	1	5,88	0	0	20
TOTAL	182	100	67	100	17	100	9	100	275

La majorité des patients de la tranche d'âge (0 à 11mois) ont eu une amélioration de leurs infections soit **86,82%**.

La tranche d'âge (0 à 11 mois) représentait **3, 29%** des décès et celle de (12 à 23 mois) représentait **5,97%** des décès.

TABLEAU XXI : Devenir des patients Selon les bactéries retrouvées

BACTERIES	Amélioré		Non Amélioré		Décédé	
	EFF	%	EFF	%	EFF	%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11	47,83	3	37,5	6	60%
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	4	17,39	2	25	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	8,69	0	0	0	0
<i>Salmonella groupe D</i>	2	8,69	1	12,5	1	10%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	8,69	1	12,5	2	20%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	4,35	1	12,5	1	10%
Autres	1	4,35	0	0	0	0
Total	23	100%	8	100%	10	100%

Streptococcus pneumoniae a été responsable de **60%** des décès.

Pseudomonas aeruginosa a été responsable de **20%** des décès.

Klebsiella pneumoniae et *Salmonella Groupe D* ont été responsable de 20% des décès des patients infectés.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

5-COMMENTAIRES ET DISCUSSION:

Du point de vue de la méthodologie:

L'étude prospective de la recherche des causes de pneumonie chez les enfants réalisée dans le service de Pédiatrie du CHU Gabriel TOURE concerne les prélèvements transportés au laboratoire du dit Gabriel TOURE pour des examens bactériologiques.

Ces prélèvements incluent le sang et les expectorations induites prélevés chez des enfants souffrant de Suspicion d'Infections Bactériennes Invasives (SIBI) comme les pneumonies, les septicémies, et autres.

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

L'intervention de l'utilisateur et les manipulations sur des bouteilles, qui consistent à faire la coloration de Gram en fonction de la turbidité observée sur les hémocultures dans la méthode classique, sont minimisées dans la méthode du BACTEC®. En effet cette dernière est basée sur l'incubation, l'agitation de toutes les cultures et un signal immédiat des positifs par les voyants lumineux, un affichage sur l'écran à cristaux liquides et une alarme sonore... tout ce qui concourt à diminuer le risque d'erreur humaine.

Les flacons positifs sont examinés alors conformément à la bactériologie de routine. La coloration de Gram, technique très importante, est accomplie avec le plus grand soin.

Quant au traitement de l'expectoration induite, il consiste à :

-Faire un frottis sur une lame de verre sec, propre identifiée en utilisant la portion la plus purulente de l'échantillon. Le frottis ne doit pas être si épais qu'il est difficile de lire après avoir été coloré, mais pas si mince au risque de perdre les agents pathogènes.

L'échantillon placé sur la lame à colorer est séché à l'air dans le cabinet de biosecurité et fixé ensuite à la chaleur.

- Faire une coloration de Gram (Ref: SOP pertinent au site spécifique)
- Utiliser le système de classement Bartlett pour évaluer la qualité de l'expectoration, en évaluant le nombre de cellules épithéliales squameuses et des neutrophiles représentée par champ à faible grossissement. Lire les résultats de coloration de Gram, d'observation à fort grossissement. Le jour suivant comparez avec les résultats de culture.(faire référence annexe 1 and 2)
- Ne pas rejeter les échantillons en raison du score Bartlett. Tous les échantillons doivent être mis en culture et les résultats enregistrés.
- Conserver les lames de coloration Gram dans une boîte à lames dans l'ordre chronologique (ne pas jeter).
- Choisissez les milieux appropriés (BA, MAC et CHO (or BHB)). Les milieux à ensemercer doivent être étiquetés indiquant le numéro d'identification de l'échantillon (ID) et la date d'innoculation.
- Ensemencer les milieux avec une goutte de l'expectoration induite ou liquide d'aspiration en utilisant la portion la plus purulante de l'échantillon et étaler en utilisant la méthode de quatre quadrants. Assurez-vous qu'une portion de la partie purulente est réservée pour la culture de la tuberculose. il est important d'utiliser une méthode standardisée d'étalage parce que cela va aider à l'interprétation des résultats de la culture. Utiliser toujours le milieu pour chaque échantillon.
- Si la gelose chocolat est utilisée, placer un disque de 10 UI bacitracine sur le deuxième quadrant de la gelose chocolat. Cela empêche la plupart des OPF et améliore la détection de H. Influenzae (il n'est pas nécessaire de le faire si la gelose BHB est utilisée)
- Après que la coloration de Gram est effectuée et les boîtes de culture ont été inoculées et faire les aliquots .

Les résultats préliminaires et définitifs des hémocultures et des expectorations induites sont saisis dans le logiciel GDH, en plus de la saisie dans le registre de travail.

Ce logiciel met en réseaux les services de consultation de la pédiatrie, le bureau CVD de la pédiatrie et le laboratoire. Il existe un transfert informatique des données via Internet entre le serveur de l'hôpital, le serveur du CVD au CNAM et celui du CVD de l'université de Maryland (Baltimore-

USA).

Du point de vue Résultat :

5.1 Difficultés et limites de l'étude:

Au cours de cette étude nous avons recensé 20 cas de perdus de vue soit un taux de 7,27% qui pourrait s'expliquer par les déménagements ou aux adresses inexactes données par les parents.

5.2. Epidémiologie :

5.2.1 Fréquence :

Sur les 275 inclusions en externe dans le service de pédiatrie au cours de notre étude, nous avons trouvé une fréquence de pneumonie bactérienne de 7,27% (20/275).

Ce résultat est inférieur à ceux de Sidibé D [40] 23,97% et Sylla M [15] 21,82% tous obtenus dans le Service de Pédiatrie du CHU Gabriel Touré. Ceci pourrait s'expliquer par la différence de taille de nos échantillons, mes prédécesseurs avaient un échantillonnage de cas plus élevé que le nôtre.

5.2.2 Sexe et Age :

La majorité de nos patients avait la tranche d'âge 0 à 11mois soit 75,27%. Cela pourrait s'expliquer par le fait que durant la première année de vie le système respiratoire n'a pas fini sa maturation et le système immunitaire serait encore immature.

Le sexe masculin a été majoritaire avec 58% soit un sexe ratio de 1,38.

Des taux comparables de sex-ratio ont été trouvés :

- En Côte D'Ivoire par Adonis et col [35] :1,36.
- Au Burkina Faso par Sawadogo et col [27] :1,16
- Au Mali par Sylla M [15] et Sidibé D [36] respectivement 1,81et 1,37.

Tous en faveur du sexe masculin.

5.2.3 Résidence :

Les communes I, V et VI du district de Bamako ont été les plus représentés respectivement 23,27 ; 20,36 et 20%.

Pour une raison ou une autre sans fondement scientifique prouvé, cela pourrait s'expliquer par :

- La population élevée de ces communes
- La promiscuité

-Mauvaise hygiène de vie.

5.2.4 Saisonnalité :

Le pic de l'incidence pour le pneumocoque se situe en mois de Mai. Ceci s'expliquerait par le fait que les rhinites sont assez fréquentes durant cette période. Les germes des voies respiratoires supérieures sont drainés par l'écoulement nasal vers l'oropharynx du nourrisson.

Dans la littérature, nous retrouvons cette augmentation de la fréquence des pneumopathies bactériennes en période froide.

Dans les pays du nord nous retrouvons une augmentation de la fréquence pendant la période hivernale [27, 37].

Cette étude révèle que l'infection à pneumocoque sévit en toute saison, avec une recrudescence au mois de Novembre, Décembre, Janvier, Février et Mai.

Des résultats similaires ont été rapportés par Selina PINOSCH à Genève [38] et Lowe Mbonda T S [39]. Selon O. Koné en 1999 le *Streptococcus Pneumoniae* persiste toute l'année [40]. Nos résultats concordent avec la Littérature, la pneumonie à pneumocoque peut être sporadique, mais elle est plus fréquente pendant l'hiver [41]. De même selon MOUTON, et all les Infections à pneumocoque prédominant de Novembre à Mai [42].

En ce qui concerne les expectorations induites nous avons observés une augmentation de fréquence d'isolement des principaux germes à savoir *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Moraxella catarrhalis* dans les mois de Mars, Mai, Aout et Septembre.

5.2.5 Bactériologie :

- Germes :

-Dans les hémocultures :

Le pneumocoque a été le germe le plus prédominant avec 47,83%. Ce résultat est supérieur à ceux de MARIKO R [43] et KY B.P [44] respectivement 32,86% et 30,70%. Une étude réalisée entre juin 2002 et mai 2005, par le CVD-Mali en collaboration avec ses alliés américains sur les maladies invasives dues au *Streptococcus pneumoniae*, a montré que le pneumocoque représentait 34,5% des germes isolés des hémocultures positives. [45]

Nous avons obtenues 17,40% de *Haemophilus influenzae* type b. Ce résultat est inférieur à ceux de KY B. P [44] et Konaté E [46] qui avaient trouvé respectivement 28,60% et 32,30% de *Haemophilus influenzae* type b dans les hémocultures positives.

Une étude clinique réalisée au CVD/Mali chez les enfants de 4-11 mois au CHU Gabriel Touré avant et après l'introduction progressive du pentavalent a révélé une baisse de cas d'infections liées au Hib de 75,00% mais le nombre de cas d'infections liées au pneumocoque reste inchangé. [47]

-Dans les expectorations induites : nous avons trouvé 29,50% de *Haemophilus influenzae*, 24,05% de *Moraxella Catarrhalis*, 14,48 de *Streptococcus pneumoniae* et 13,66% de *Staphylococcus aureus* ont été les germes les plus fréquemment isolés.

5.2.6 Sensibilité aux antibiotiques :

-Streptococcus pneumoniae :

Streptococcus pneumoniae a été sensible pour la majorité : 100% à l'Erythromycine, 90,90% à l'oxacilline et 72,72% au Chloramphénicol alors que nous avons trouvé une résistance au cotrimoxazole et à la tétracycline respectivement 72,72% et 90,90%. Cette résistance élevée peut être due à l'automédication ou à la mutation du germe.

En comparaison avec l'étude de BOLDUC en 2004, qui a montré 28% de résistance à l'érythromycine qui était 10% en 1997 puis 25% en 2003 [48]. Une étude de surveillance réalisée en Gambie en 2006, a montré 14,3% de résistance à la pénicilline et 4% de souches intermédiaires, 0,3% de résistance à la céfotaxime et 0% à l'érythromycine [49].

- Haemophilus influenzae type b :

Sa sensibilité était de 100%, à la Ciprofloxacine et à l'amoxicilline /acide clavulanique, 75% au chloramphénicol et à l'Ampicilline. Par ailleurs nous avons constaté une sensibilité de 50% au cotrimoxazole et une résistance quasi constante à la tétracycline.

Ces taux élevés de résistance est explicable en parti par l'automédication.

Dans la littérature nous rapporte une augmentation modérée de la CMI de l'ampicilline des céphalosporines de 1^{ère} et 2^e générations et de l'imipénème. Les Céphalosporines de 3^e génération restent cependant encore actives.

L'incidence de ce type de résistance est faible 1%. Une étude réalisée dans deux départements Français (Val-de-Marne et Haute Garonne) entre 1980 et 1990 a montré une augmentation progressive de l'incidence de la résistance à l'ampicilline, incidence inférieure à 25% en 1980 et atteignant ou dépassant 50% à partir de 1987[50]. Une incidence comparable a été trouvée en France par le centre national de référence [51].

-Staphylococcus aureus : Les souches de *Staphylococcus aureus* étaient sensibles à 98% pour la ciprofloxacine et la gentamycine, le chloramphénicol à 96% et une sensibilité de 90% à l'oxacilline, 88% pour le cotrimoxazole et 84% à l'érythromycine. Nous avons observés une résistance de 88% à la tétracycline et 80% à la Pénicilline G. Ce taux élevé de résistance est sûrement dû à l'automédication et la systématisation de la pénicilline G dans le traitement de routine des infections banales.

-Moraxella catarrhalis : les souches de *Moraxella catarrhalis* était résistante à l'ampicilline.

- Pseudomonas aeruginosa :

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* était sensible pour la majorité : 100% de sensibilités à la ciprofloxacine, l'imipénème et à la Gentamycine, 50% de sensibilité au Cefotaxime soit une résistance de 50%.

5.2.7 Devenir des malades :

Nous avons eu un taux de guérison de 86,18% contre 3,64% de décès. Ce taux de létalité a été inférieur à ceux des travaux au Mali D Sidibé [40], et M Sylla [15] qui avaient trouvé respectivement 17,4 et 7,20% de létalité. En Côte D'ivoire ADONIS et col [41] avaient trouvé un taux de létalité de 4,5%.

La létalité par rapport à l'âge dans notre étude montre que la tranche d'âge (0 à 11 mois) représentait 60% des décès et celle de (12 à 23 mois) représentait 40% des décès ; cela montre que les enfants de moins de 2 ans ont été beaucoup plus vulnérables à ces infections et d'une manière prédominante pour l'infection à pneumocoque avec 40% de décès.

Ces taux de décès peuvent être dû au retard dans le délai de consultation, au terrain sous-jacent de malnutrition, l'insuffisance des moyens de prévention, les pathogènes les plus fréquents et leur virulence ainsi que le bas âge des enfants.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

6 -CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS :

6.1 CONCLUSION :

Nous avons réalisé une étude transversale prospective allant de Décembre 2012 au Novembre 2013 chez les enfants âgés de 29jours à 59mois souffrant de Suspicion d'Infections Bactériennes Invasives (SIBI) dont les cas de Pneumonies dans le service de pédiatrie du CHU-GT. Au terme de cette étude nous avons recensé 275 enfants dont 40 cas d'hémocultures positives soit 14,55% parmi ces cas nous avons obtenues 20 cas de pneumonies bactériennes confirmées soit une fréquence de 7,27%. Dans les expectorations induites nous avons isolés 366 bactéries dont 311 Concernaient les espèces bactériennes les plus fréquemment isolées à savoir *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*.

Le sexe masculin a été le plus prédominant avec 58% et un sexe ratio(1,38)

La majeure partie des cas ont été enregistré aux mois de Mars, Mai et Septembre.

Les communes I, V et VI ont été les plus représentées.

La tranche d'âge 0 à 11 mois a été la plus touchée.

Dans les Hémocultures : *Streptococcus pneumoniae* a été le germe le plus fréquemment isolé soit 47,83% suivi de *l'Haemophilus influenzae* type b(Hib) à 17,40%, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* 8,69% chacun.

Dans les expectorations induites : nous avons obtenu 29,50% de *Haemophilus influenzae*, 24,05% de *Moraxella catarrhalis*, 14,48% de *Streptococcus pneumoniae* et 13,66% de *Staphylococcus aureus* ont été les germes les plus fréquemment isolés.

La majorité des germes était sensible à la Ciprofloxacine (100%), à l'érythromycine, l'oxacilline (90,90%) et le Chloramphénicol (75%).

Nous avons trouvé des résistances au cotrimoxazole (50%), à la Pénicilline G (88%) et à la tétracycline (90,90%).

Streptococcus pneumoniae a été responsable de 40% des décès.

La létalité a été de 3,64%.

6.2 RECOMMANDATIONS :

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires :

- La promotion des projets de recherche médicale type CVD-MALI.
- L'Équipement et la formation du personnel des laboratoires de biologie médicale pour le diagnostic des maladies bactériennes invasives.
- La formation du personnel à la prise en charge adéquate des Suspensions d'Infections Bactériennes Invasives.
- De continuer et de renforcer les études de surveillance des infections bactériennes.

• Aux personnels de santé :

- Prévenir à travers les IEC la population sur les maladies infectieuses.
- Réviser régulièrement le protocole thérapeutique selon les résultats de la Recherche.

• A la Population :

- Vacciner correctement les enfants contre les maladies cibles du PEV.
- Renforcer les mesures hygiéno- diététiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

7-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

1.FORMULAIRE DE CONSENTEMENT LIBRE ET ÉCLAIRÉ-CAS

CVD-MALI:

Page 1 sur 5 Version 3.0 du 03 Oct.2012.

2.OMS. LA PNEUMONIE CHEZ L'ENFANT. GENÈVE: Organisation mondiale de la Santé 2013 disponible sur: <http://www.who.int/fr.pdf.2013.Consulté le 10-7-2013>.

3.COULIBALY N, DUCHASSIN M, YAPI A, LAMARQUE G, FADIGA M, REY J L.

Etiologies des pneumopathies bactériennes à propos de 130 cas recrutés à la consultation de pneumologie du CHU de Cocody.Rev Med Côte d'Ivoire 1986;**75**:50-2.

4.STAHL J P.15ème Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse. Texte court: Prise en charge des infections des voies respiratoires basses de l'adulte immunocompétant. Mars 2006; 21p.

5. SHALEEN S O, STERNE J A, TUCKER J S, FLOREY C D.

Birth weight, childhood lower respiratory tract infection, and adult lung function. Thorax1998; **7**:549-53.

6.LEOPHONTE P. PNEUMONIES. Paris: John Libbey Eurotex,2001; 260p.

7.CHIDIAC C, MOUTON Y, HUCHON H, LEOPHONTE P, PORTIER H, ROGEAUX Y et al. Révision de IVème Conférence de Consensus en Thérapeutique anti-infectieuse de la Société de Pathologie Infectieuse de Langue Française (SPILF). Prise en charge des infections des voies respirestaires basses. Med Mal Infect 2000; **30**:566-80.

8.BOURRILLON A. Infection des voies respiratoires basses: bronchite, bronchiolite, pneumopathie. In: Aujard Y, eds. Maladies infectieuses de l'enfant. Paris: Pradel, 1998;165-73.

9.RUHT PW, MAVIS N, BONGANI M, GENE A SH, KATHLEEN A P, QUING QD et al. IRA: Diagnostic et prise en charge des IRA par des personnes administrant les soins. Les guerisseurs et les agents de Santé à l'enfant, SWAZILAND (USAID –CDC) N°698-0421.1991:1-32.

10.COULIBALY D. Evaluation de la définition clinique du SIDA pédiatrique selon les critères dans le service de Pédiatrie de l'hôpital Gabriel Touré. Thèse Med, Bamako,1996; n°52.

11.COUVREUR J. Les broncho-pneumopathies de l'enfant. Paris: Masson,1988; 279p.

12.AMOIKONAKA BJ. Facteurs de Risques des IRA chez l'enfant de 0 à 6 ans à la PMI de Cocody. Thèse Med, Abidjan, 1992.

13.BELEG M N. IRA basses de l'enfant: modalités de prise en charge et coût de traitement à Yaoundé.Thèse Méd, Bamako,1997.

14.TRAORÉ M K. Approche Epidémiologique des IRA chez les enfants de 0 à 59mois en milieu Urbain. Thèse Med, Bamako,1990.

15.SYLLA M. Infections respiratoires aiguës basses: Prise en charge et coût en milieu hospitalier pédiatrique à Bamako. Thèse Med, Bamako, 1988.

16.BOLES JM, CARDINAUD JP, GIBERT C, JAEGER C, OFFENSTADT G, SAULNIER F et al.Réanimation médicale.Paris: Masson, 2002;1822p.

17.WUBBEL L, MUNIZ L, AHMED A, TRUJILLO M, CARUBELLI C, MC COIQ C et al. Etiology and treatment of community- acquired pneumonia in ambulatory children – Journée Parisienne de Pédiatrie 1999.

18.CLAESSON BA, TROLLFORS B, BROLIN I, GRANSTRÖM M, HENRICHSEN J, JODAL U et al. Etiology of community acquired pneumonia in children based on antibody responses to bacterial and viral antigens. *Pediatric Infect Dis J* 1989;**8**:856-61.

19.WANG EL, LONGS S. Acute uncomplicated pneumonia In: SS Long, LK, Pickering CG, eds. *Prober pediatric infectious diseases*. New York: Churchill-Livingstone 1997; 250-7.

20.BOURRILLON A. Infection des voies respiratoires basses: bronchite, bronchiolite, pneumopathie In: Aujard Y, eds. *Maladies Infectieuses de l'enfant*. Paris: Pradel,1998; 165-73.

21.OMS: Les infections respiratoires aiguës WHO/ARI 90:17.

22.BLOCK S, HEDRICK J, HAMMERSCHLANG MR. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in pediatric community-acquired

pneumonia: Comparative efficacy and Safety of Clarytromycin VS, Erythromycin ethylsuccinate. *Pediatr Infect Dis J* 1995; **14**: 471-77.

23.GRAYSTON JT. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) infections in children *Pediatr Infect Dis J* 1994;**13**:675-85.

24.FAYON M, SARLANGUE B, DEMARQUEZ JL. Pneumopathies Communautaires graves chez l'enfant non immunodéprimé. Journée Parisienne de Pédiatrie 1999.

25.ISAC D. Probléms in determing the etiologiy of Community-acquired childhood pneumonia.*Pédiatr Infect Dis J* 1989;**8**:143-8.

26.COULIBALY N. Place de la détresse respiratoire dans les infections respiratoires aiguës basses en milieu hospitalier pédiatrique à Bamako. Thèse Med, Bamako, 2001.

27.SAWADOGO S, REIHNAR DT, SANOU I, KAM K, KOUETA F, OUEDRAOGO S et al. Les pneumopathies de l'enfant en milieu hospitalier pédiatrique de Ouagadougou 2001.

Disponible WWW. CHU-Rouen.fr/chnpo/annales.

28.KALIFA G, PANISSET S, HAMIDOU A. Données radiologiques des infections respiratoires basses de l'enfant. *Méd Thér Pédiatr* 1999;**2**: 26-7.

29.MARC E, GENDEREL D, MOULIN F, CHAUSSAIN M. Recherche des sequelles par les explorations fontionnelles respiratoires des pneumonies communautaires de l'enfant. *Méd Thér Pédiatr* 1999;**2**:51-5.

30.FRIEDLAND IR. Comparaison of the reponse to the antimicrobial therapy of penicillin-resistant and penicillin susceptible pneumococcal diseases. *Pediatr Infect Dis J* 1995;**14**:885-90.

31.DUBUS JC. Les traitements non antibiotiques des pneumopathies communautaires de l'enfant. *Arch Pediatr* 1998;**5**:62S-66S.

32.SARDETA VU, THIEN H, BACULAR A. Pneumococcal bronchopneumopathy in children. 6th Interm Cong Infect Dis .Prague, Avril 1994, abtract 1048.

33.FATTORUSSO V, RITTER O. Vademecum clinique: Du diagnostic au traitement, 18^{ème} édition. Paris: Masson, 2006;2047p.

- 34. PATWARI AK, ANEJA S, MANDAL RN, MULLICK DN.** Acute Respiratory Infections in Children: A Hospital based Report-Indian. *Pédiatr* 1988; **25**:613-7.
- 35. DONIS L Y, AMON-TANONH AM, CAMARA R, KOUADIO VA, KOFFI O, EHUE A et al.** Profil général des affections respiratoires inférieures de l'enfant dans le service de pédiatrie du CHU de Yopougon. *Med Afr Noire* 1994 ; **129** :29-34.
- 36. SIDIBÉ D.** Pneumopathies bactériennes au service de Pédiatrie du CHU Gabriel Touré (à propos de 109 cas) .Thèse de Méd, Bamako,2006.
- 37. GESLIN P.** Bêta-lactamines et pneumocoques multirésistants isolés en France. *Méd Hyg* 1995 ; **53** :2111-8.
- 38. PINOSCH S.** Infections invasives à *Streptococcus pneumoniae* dans la population Genevoise de 1989 à 2000. Thèse Méd, Genève ,2005 ; n°10417.
- 39. MBONDA S L.** Infections bactérienne à *Streptococcus pneumoniae* dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré, Février 2002 à Février 2003. Thèse Méd, Bamako, 2003 ; n°36.
- 40. KONE O.** Approche épidémio-clinique des méningites purulentes Observées en pédiatrie de l'HGT de 1994 à 1998. Thèse Méd, Bamako, 1999.
- 41. [HTTP://WWW.INSTITUTPASTEUR](http://www.institutpasteur.nc) NC :** Observatoire régional du pneumocoque en Nouvelle Calédonie (ORP-NC).
- 42. MOUTON Y, BRION M.** Infections à pneumocoque. *Encycl Méd Chir, Maladies Infectieuses*, 1979.
- 43. MARIKO R.** Caractères bactériologiques et place de *Streptococcus pneumoniae* isolé au laboratoire CVD dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE. Thèse Pharm, Bamako, 2005.
- 44. KY B.** Fréquence d'isolement de *Haemophilus influenzae* type b au laboratoire du CHU Gabriel TOURE avant et après l'introduction du vaccin pentavalent dans le PEV. Thèse Pharm, Bamako, 2010.

- 45. CAMPBELL JD, KOTLOFF KL, SOW SO, TAPIA MD, DIALLO S, KEITA MM et al.** Invasive pneumococcal infections among hospitalized children in Bamako, Mali. *Pediatr Infect Dis J* 2004; **7**:642-9.
- 46. KONATE E.** Caractères bactériologiques et place de *Haemophilus influenzae* type b isolé au laboratoire CVD dans les infections bactériennes invasives chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie de l'hôpital Gabriel TOURE de Novembre 2003 à Octobre 2004. Thèse Pharm Bamako, 2005.
- 47. SOW SO, TAPIA MD, DIALLO S, CAMPBELL JD, KEITA MM, SYLLA MM et al.** *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine introduction in Mali: impact on disease burden and serologic correlate of protection. *Am J Trop Med Hyg* 2009; **80**(6): 1036.
- 48. HTTP: // WWW.RRSSS12.GOUV.QC.CA / documents / bulletin contact-** vol.12 n°4-Novembre 2005. PDF
- 49. HILL PC, CHEUNG Y B, AKISANYA A, SANKAREH K, LAHAI GREENWOOD B M, et al.** Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Gambian villagers. *Clin Infect Dis* 2006; **43** (9): 673.
- 50. GEORGENSEN J H, DOERN G V, MAHER LA.** Antimicrobial resistance among respiratory isolates of *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**:2075-80.
- 51. BELEMOU B.** Les manifestations respiratoires du VIH Sida pédiatrique au CHU GT à propos de 141 cas Bamako. Thèse Méd, Bamako, 2001.

ANNEXES

ANNEXE1 : RARTT SYSTEME DE CLASSEMENT : pour évaluer les échantillons de crachats Selon Bartlett.

Nombre de neutrophiles représenté par LPF (x10 objectif)	Grade
<10	0
10-25	+1
>25	+2
Présence of mucus	+1
Nombre de cellules épithéliales représenté par LPF (x10 objectif)	Grade
<10	0
10-25	-1
>25	-2
Score Bartlett Total	

Note : Un minimum de 20 champs doit être observé pour assurer que vous observez un champ représentatif.

Négatif (-Ve) lorsque les nombres vus sur le frottis sont attribués à des cellules épithéliales squameuses indiquant une contamination de la sécrétion oropharyngée (salive).

Positif (+Ve) sont attribués à la présence de polynucléaires neutrophiles (indiquant la présence d'inflammation active).

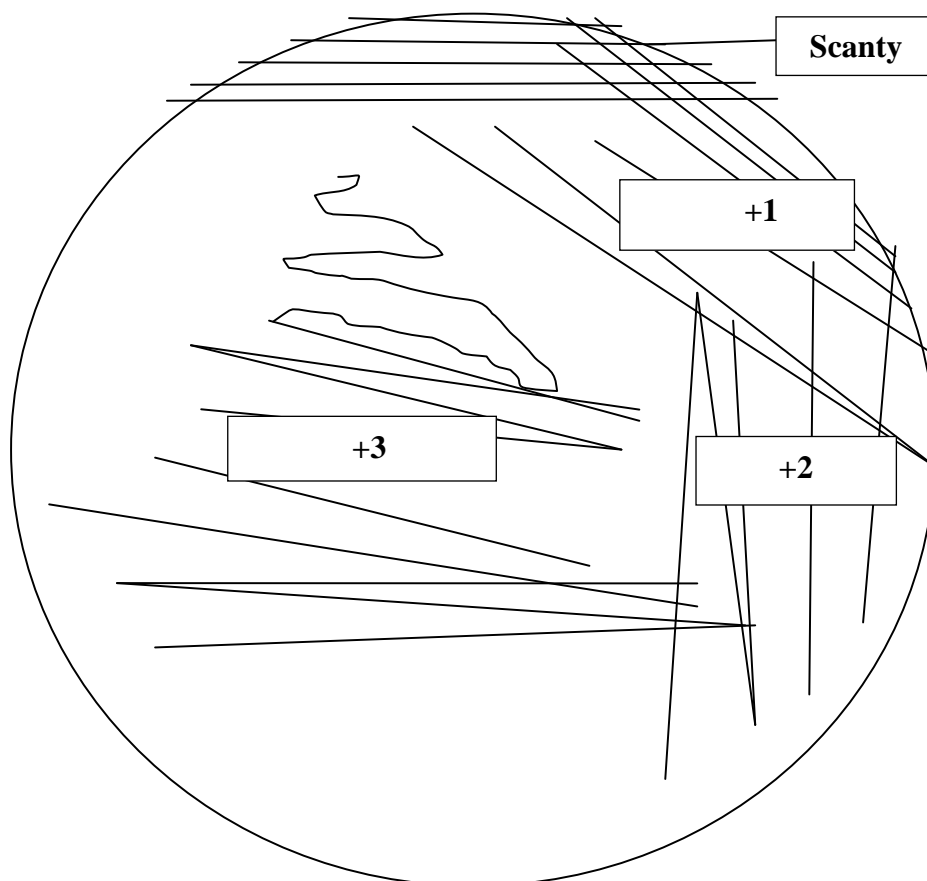
La détermination l'ampleur de -Ve et +Ve dépend du nombre relatif de cellules épithéliales et des polynucléaires neutrophiles.

Un score final de zéro (0) ou moins indique soit l'absence de réponse Inflammatoire ou la présence de contamination par la salive importante.

ANNEXE 2 : La quantité relative de bactéries dans les expectorations observées avec la coloration de Gram

Les bactéries représentées par HPF (x100 objectifs, l'huile)	Quantité
1	scanty
1-9	1+
10-99	2+
≥100	3+

ANNEXE 3 : modèle d'ensemencement de la gélose



Appendix 4: tests required for identification of selected organisms

Streptococcus pneumoniae

- Diplocoques à Gram-positif
- Colonies α -hémolytiques sur gélose au sang avec l'aspect draghtman-like ou mucoïde
- Optochine sensibles
- Bile solubilité (S-pneumoniae sont bile soluble). Doivent toujours être effectués sur des isolats qui sont Optochine intermédiaires (c.-à-zone 9-13 mm).
- Sérotypage

Haemophilus influenzae

- Coccobacilles à Gram négatif
- La croissance sur gélose chocolat (colonies gris), mais peu ou pas de croissance sur gélose au sang (à moins que satellitisme autour des colonies de S.aureus)
- X et les facteurs V (nécessite les deux)
- Sérotypage

Moraxella catarrhalis

- Diplocoques à Gram négatif
- La croissance sur le sang et la gélose chocolat en gris ou blanchâtres opaque colonies
- Facilement poussé sur la surface de la gélose (test de « push »)
- Produit butyrate estérase et DNase positive. Chacun de ces tests peuvent être utilisés pour confirmer l'identification avec les caractéristiques ci-dessus.
- N'utilise pas le glucose, saccharose, lactose ou maltose.

Staphylococcus aureus

- Cocci à Gram positif et les clusters
- La croissance sur le sang et chocolat comme blanc au jaune, souvent avec la zone de β -hémolyse
- Catalase test (positif)
- Coagulation test (négatif)
- DNase test (positif) peut être utilisé pour une confirmation supplémentaire

B-Hemolytic streptococci

- Cocci à Gram positif dans en chaîne
- B-hémolytiques sur gélose au sang
- Catalase test (négative)
- Lancefield groupement
- PYR test (positif) pour les streptocoques du groupe A

Bacilles Gram-négative

- L'identification est basée sur des algorithmes standards (comme dans le Manuel of Clinical Microbiology) en utilisant la coloration de Gram et la morphologie coloniale, la fermentation du lactose sur gélose MacConkey, test de l'oxydase, STI ou KIA, et les tests biochimiques comme l'indole, et le citrate (comme tests individuels ou en panneaux d'identification commerciale).

Cryptococcus neoformans

- Apparition similaire au levure sur la coloration de Gram
- Colonies de couleur crème sur gélose au sang
- Présence de la capsule démontrée par l'encre de chine ou une autre méthode

Uréase test (positif)

FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom: Diallo

Prénoms: Mamadou Alpha

Tel: +22379079463

Nationalité: Mali

e-mail: mad0587@yahoo.fr

Titre de la thèse:

Prévalence des bactéries isolées des hémocultures et des expectorations induites chez les enfants admis pour cause de pneumonie au CHU Gabriel Touré de Bamako de Décembre 2012 au Novembre 2013.

Année académique: 2013-2014

Ville de Soutenance: Bamako

Pays: Mali

Lieu de dépôt: Bibliothèque de la Faculté de médecine de pharmacie et de l'Odontostomatologie

Domaines d'intérêt: Pédiatrie, Santé publique, bactériologie, vaccinologie.

Résumé:

Il s'agit d'une étude transversale prospective, qui a été menée dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Touré durant la période 2012 à 2013 et dont l'objectif principal était de déterminer les principales bactéries isolées à des hémocultures et des expectorations induites chez les enfants admis pour cause de pneumonie en Pédiatrie du CHU Gabriel Touré.

Notre échantillon était composé de 275 patients, répartis en 159 garçons soit 58% et 116 filles 42%.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

- Une fréquence de 7,27%
- Une prédominance masculine de 58% et un sex-ratio de 1,38.
- La majorité des cas ont été observés aux mois de mars, mai et septembre.
- Les enfants de moins de deux ans ont été prédominants avec plus de 75,27%.
- Les Commune I, V et VI sont les plus représentées.

- *Streptococcus pneumoniae* a été le germe le plus fréquemment retrouvé avec 47,83%, suivie par *Haemophilus influenzae* de type b à 17,40%, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* 8,69 chacun dans les hémocultures.
- *Haemophilus influenzae* (29,50%), *Moraxella catarrhalis* (24,05%), *Streptococcus pneumoniae* (14,48%) et *Staphylococcus aureus* (13,66%) ont majoritaires dans les expectorations induites.
- *Streptococcus pneumoniae* a été sensible à la majorité des antibiotiques 100% à l'oxacilline et l'érythromycine 72, 72% pour le chloramphénicol.
- Nous avons observé 86,18% d'amélioration.
- 3,64% sont décédés.
- Les Nourrissons 0-11 mois ont été les plus vulnérables.
- Le pneumocoque a été responsable de la majorité des décès soit 40%.

MOTS CLÉS: Bactéries, Pneumonie, Enfant.

SHEET

Name: Diallo

First Name: Mamadou Alpha

Tel: +22379079463

Nationality: Malian

email: mad0587@yahoo.fr

Title of thesis:

Prevalence of bacteria isolated from blood cultures and induced sputum in children admitted due to pneumonia at Gabriel Touré Hospital in Bamako, from December 2012 to November 2013.

Academic Year: 2013-2014

City of defense: Bamako Country: Mali

Place of deposit: Library of the Faculty of Medicine Pharmacy and Dentistry.

Areas of interest: Pediatrics, Public Health, bacteriology, Vaccinology.

Summary:

This is a prospective cross-sectional study , which was conducted in the pediatric ward at the University Hospital Gabriel Toure during the period from 2012 to 2013 and whose main objective was to identify the main bacteria isolated from blood cultures and induced sputum among children admitted due to pneumonia Pédiatric CHU Gabriel Touré .

Our sample consisted of 275 patients, divided into 159 boys and 58% 116filles 42%.

We got the following results:

- A frequency of 7.27%
- A male predominance 58% and a sex ratio of 1.38.
- The majority of cases were reported in the months March, May and September.
- Children less than two years were predominant with over 75.27 %.
- Common I, V and VI were the most represented.

- *Streptococcus pneumoniae* was the organism most frequently found to be 47.83 %, followed by *Haemophilus influenzae* type b to 17.40 %, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* 8.69 each in the blood cultures.
- *Haemophilus influenzae* (29.50 %) , *Moraxella catarrhalis* (24.05%) , *Streptococcus pneumoniae* (14.48%) and *Staphylococcus aureus* (13.66 %) were the majority in induced sputum .
- *Streptococcus pneumoniae* was sensitive to most antibiotics 100% to oxacillin and erythromycin .72, 72 % for chloramphenicol.
- We observed 86.18 % improvement;
- 3.64 % died.
- Infants 0-11 months were the most vulnerable.
- The pneumococcus was responsible for the majority of deaths is 40%.

KEY WORDS: Bacteria, Pneumonia, Child.

SERMENT DE GALIEN



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

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

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

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

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

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

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

Je le jure !