

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



## Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité : microbiologie de l'environnement, Santé, eau et environnement

### Thème

## Bactériologie des hémocultures

Présenté par :

Abdaoui Naima

Gherabe Wided

Rouabhia Khadidja

Devant le jury composé de :

Président : M. DJEKOUN Mohamed (M.A)

Examineur : M. ATOUSSI Sadek (M.A)

Encadreur : M. HOUHAMDI Moussa (Pr)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2011

## Remerciements

*Au terme de ce travail*

*Nous remercions notre Dieu de nous avoir accordé notre connaissances de la science et de nous avoir aidé à réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier tout particulièrement notre encadreur Pr Houmamdi Moussa qui nous a fait grand honneur de bien vouloir nous encadrer, son aide, son suivi et ses critiques constructives.*

*On remercie les membres de jury Mr Djekoun Med, le président et l'examineur Mr Atoussi S, d'avoir accepté de juger notre présent travail.*

*On tiens à remercier tous les enseignants qui nous ont suivis durant notre formation.*

*Nous remercions notamment Mr Bentorki, Mr Saidia qui nous ont aidé beaucoup, et nous les souhaitons tout le bon heur du monde.*

*Nous remercions aussi tous le personnel laboratoire de bactériologie de l'hospital Ibn Zohr de Guelma, en particulier Mme Saidia .F.*

*Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont soutenu et aider de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.*

## DEDICACE

*Aux deux êtres les plus chers dans ma vie, mes parents qui me  
donnent le courage et me guident dans ma vie.*

*A ma sœur Asma,*

*mes frères Hassib, Rami et Med Said,*

*mes deux jumeaux Naim et Ab.El Hamid,*

*A mes belles sœur Ahlem et Chiheze*

*mon neveu Nadir*

*mes nieces Doha, Meriem, ALA El Rahmen*

*mes cousines Hassina, Bahia ,Hanna, Amira, Karima, Imen et*

*Houda*

*et a toute ma famille.*

*A Wided et Khadidja*

*Mes amies Mouna, Meriem, Amira, Meriem ,Sarra et Sarra*

*(SISSA).*

*A toutes mes amies de promotion 2010/2011*

*Naima*

## DEDICACE

*A mon dieu qui me donne tous ; la santé, le  
savoir et la patience...*

*A mes parents qui me donnent le courage et  
me guident dans ma vie surtout ma mère.*

*A ma sœur FATIMA et sa famille surtout  
TAKI ISLEM.*

*A mes frères MOUNIR, TOUFIK et  
YOUSSEF.*

*A mes deux amies HENEN et ISMEHEN.*

*A mes cousins tout à son nom.*

*A toutes mes amies de promotion 2010/2011.*

*Merci*

*Cherab Wided*

## DEDICACE

*A mon dieu qui me donne tous ; la santé, le  
savoir et la patience...*

*A mes parents qui me donnent le courage et  
me guident dans ma vie surtout ma mère.*

*A mes sœurs KARIMA et SOUMIA et*

*A mes frères ABD ELLAZIZ et  
ZAKARIA.*

*A mon cher époux Sofiane et sa famille.*

*A tous mes amies.*

*A tous ma famille.*

*Khadija*

## Sommaire

Introduction	
I-Données physiopathologiques	1
1-Bactériémie	1
1-1- Bactériémie transitoire	1
1-2- Bactériémie intermittente	1
1-3- Bactériémie continue	1
2- Septicémie	1
II-Hémoculture	4
1-Définition	4
2-Objectif	4
3-Indication	4
4-Contre indication	5
5-Les agents étiologiques	5
5-1-Les agents pathogènes spécifiques	5
5-2- Les agents pathogènes opportunistes	5
Chapitre II: matériel et méthode	6
1- Echantillonnage	6
2- Technique d'analyse	6
2-1-prélèvement sanguin	6
2-2-L'acheminement au laboratoire	9
2-3- Suivit au laboratoire	10
2-4- Repiquage sur milieu solides	11
2-5-L'identification	16
2-5-1-L'étude microscopique	16
2-5-1-1-l'état frais	16
2-5-1-2-Coloration de Gram	16
2-6-Les tests de l'identification biochimique	17
2-6-1- Fermentation de mannitol	17
2-6-2- Recherche de l'oxydase	17
2-6-3- Recherche de catalase	18
2-6-4-Recherche de Coagulase	18

2-6-5-Recherche deDNase .....	18
2-6-6- Les tests de la galerie API 20 E .....	19
2-7- L'antibiogramme .....	22
Chapitre III: résultat et discussion.....	24
I-Résultats .....	24
1-Résultat de prélèvement .....	24
2-Résultat de l'étude macroscopique et microscopique .....	25
3- Résultat de l'identification biochimique .....	28
3-1- Résultats de la galerie API 20 E .....	28
3-2-Résultats des tests biochimique .....	29
4-Résultats de l'antibiogramme.....	30
5-Résultats de l'étude statistique .....	33
5-1-Répartition de l'hémoculture selon l'âge et le sexe .....	33
5-2- Répartition mensuelle de l'hémoculture .....	34
II-Discussion et interprétation des résultats .....	35
Conclusion	
Annexe	
Bibliographie	

Produced with Scantopdf

## Liste des tableaux

tableau	page
Tableau1 : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité.	11
Tableau2: Hémocultures spécifiques.	16
Tableau3:Extrait du tableau de lecture de la galerie API20E.	21
Tableau4 : les testes biochimiques réalisés pour les échantillons étudiés.	23
Tableau5 : Etude macroscopique de nos prélèvements	25
Tableau6 : Résultat de culture	26
Tableau7 : résultat de Galerie biochimiques de <i>Enterobacter cloacae</i> et de <i>E.col.</i>	29
Tableau8 : Résultats des tests biochimiques.	30
Tableau9 : Résultats de l'antibiogramme	32
Tableau10 : répartition d'hémoculture selon le sexe et l'âge.	34
Tableau11 : Répartition mensuelle d'hémoculture.	35

Produced with Scan PDF

## Listes des figures

Figure	page
Figure1 : Le choix du point de prélèvement.	10
Figure2 : la fermentation du mannitol.	18
Figure3 : les étapes de l'ensemencement de la galerie API20E	22
Figure4 : présentation schématique d'un antibiogramme.	24
Figure5 : les différents aspects macroscopiques des flacons d'hémocultures.	26
Figure6 : aspect macroscopique des colonies.	27
Figure7 : vue microscopique du résultat de Gram.	28
Figure8 : Résultats de la galerie API 20E.	30
Figure9 : Résultat de l'antibiogramme de la souche <i>S.epidermidis</i> .	31
Figure10 : Répartition d'hémoculture selon l'âge et le sexe.	34
Figure11 : Répartition mensuelle d'hémoculture.	35

Produced with ScanTopDF

## Liste des abréviations

ADN : Acide desoxyribonucleique  
AMX : Amoxyline  
ATB : Antibiotiques.  
C : Céphalosporine  
CIP: Ciprofloxacine  
CM :Gentamycine  
CMI : Concentration minimale d'inhibition.  
CRO : Ceftriaxone  
CTX: Céfotaxine  
CZ : Céfazoline  
DO :Doxémicine  
E :Erythromycine  
FF :Fosphomycine  
GN : Gélose nutritive.  
GSC : Gélose au sang cuit.  
HFT : Homogenous fluorescence technology.  
IMP :Imipenem  
L :Lincomycine  
MF: Mcfarland  
MH : Mueller Hinton.  
OX :Oxacyline  
P : Peniciline  
PB :Polymixine  
PH : Potentiel en hydrogène.  
PIP :Piperamycine  
PPLO: Pleuropneumoniae like organisms.  
PT :Préstimamycine  
SPS : PolyanétoI-Sulfonate de Sodium  
TEC :Técarcyline  
TM : Tobramycine

## Introduction

Le sang est le grand moyen de communication entre les cellules, les tissus et les organes de notre organisme car il transporte les éléments nutritifs et autres substances nécessaires à leurs fonctionnements.

Pour qu'il peut assurer le bon fonctionnement de notre organisme il doit être dans un état stérile, malheureusement, il peut être infecté par des microorganismes qui vont provoquer des pathologies de différents types qu'on nommes "les hémopathies" qui peuvent aller d'une bactériémie transitoire jusqu'au choc septiques ou un état infectieux grave ce qui explique les états des hémopathies malignes comme chez le cas des immunodéprimés.

L'hémoculture reste la technique la plus performante pour diagnostiquer et identifier les germes (bactéries) responsables des septicémies. Cependant elle exige un délai souvent incompatible avec l'urgence de la situation.

Les bactéries responsables des septicémies ou de bactériémies sont très variés et de différents formes donc, il faut parfois faire preuve d'ingéniosité pour les isoler et les identifier. L'hémoculture est un examen capital en pathologie infectieuse mais il n'est pas toujours pratiqué.

Notre objectif est d'isoler et d'identifier les bactéries présentent dans le sang au cours des septicémies par hémoculture et d'étudier leur sensibilité vis-à-vis aux antibiotiques.

# **Chapitre I:**

## **Partie**

### **théorique**

Produced with ScanTopdf

## I-Données physiopathologies:

### 1-Bactériémie:

C'est le passage des bactéries dans la circulation sanguine ; elle peut être transitoire, intermittente ou continue.

#### 1-1-Bactériémie transitoire:

Elle est une décharge de quelques minutes à quelques heures de bactéries dans le sang, survenant après une irritation d'une muqueuse colonisée par une flore microbienne ou une manipulation des tissus infectés. Elle peut être spontanées (brossage dentaire) ou provoquée par des gestes invasifs telle les soins dentaires, la mise en place d'une sonde urinaire... [Site]<sup>1</sup>

#### 1-2-Bactériémie intermittente:

Ce type de bactériémie est retrouvé au cours des infections par les Bacilles à Gram négatif, la pneumonie et l'ostéomyélite. Elle survient disparaît puis revient avec le même germe. Elle est classiquement associée à une infection cloisonnée non ou mal drainée, tel un abcès intra-abdominal, ou un empyème sous dural, mais se voit aussi dans les infections tissulaire focalisées. .... [Site]<sup>1</sup>

#### 1-3-Bactériémie continue:

Elle est observée dans la fièvre typho-paratyphoïdique, la Brucellose, l'endocardite. Le sang est continuellement inoculé par des germes, soit à partir d'un foyer ganglionnaire (Adénite mésentérique dans la fièvre typhoïde), soit à partir de l'endocarde ou d'un autre foyer endovasculaire. .... [Site]<sup>1</sup>

#### Remarque:

Dans les bactériémies continues et les bactériémies intermittentes, il existe un foyer microbien qui libère des décharges de germes dans la circulation sanguine, soit via le système lymphatique (Canal thoracique), soit directement dans le sang

### 2- Septicémie:

La septicémie correspond à la présence de bactéries vivantes dans le sang associé au syndrome de la réponse inflammatoire.

Donc, la bactériémie peut s'étendre à la septicémie si la décharge microbienne dans le sang est massive ou si l'agent microbien a la capacité de se multiplier rapidement dans la circulation sanguine, puisque le système réticulo-endothéliale (qui assure la détersion des bactéries au cours des bactériémies) est incapable d'éliminer les germes qui ont accédés à la circulation sanguine, dont on va assister à la formation des métastases septiques. ... [Site]

Selon la porte d'entrée du germe dans le sang et le foyer tissulaire; on distingue trois principaux mécanismes physiopathologiques expliquant la septicémie:

⇒ **Mécanisme thrombophlébitique:**

La porte d'entrée est souvent tégumentaire (manipulation d'un furoncle, brèche cutanée traumatique ou chirurgicale, corps étranger). Le foyer se constitue au voisinage de la porte d'entrée et consiste en un coagulum de fibrine infiltré de cellules sanguines et immunitaires et colonisées par les bactéries (thrombus infecté). De ce thrombus se détachent irrégulièrement des fragments (microembols septiques) qui ensemencent massivement le sang. Les métastases sont fréquentes et intéressent surtout les tissus pulmonaires, nerveux, rénaux, et le système réticulo-endothélial. L'aspect de la courbe thermique est irrégulier (fièvre désarticulée) les germes en cause sont surtout des *Staphylocoques* et des *Streptocoques*. (Faucher 1997).

⇒ **Septicémie à point de départ lymphatique:**

La porte d'entrée est souvent digestive. Les bactéries pathogènes traversent la muqueuse intestinale et se multiplient notamment au niveau des ganglions mésentériques qui constituent le foyer. A partir de ces foyers mésentériques, quelques bactéries peuvent gagner le sang par le canal thoracique et aller constituer des métastases notamment dans le tissu réticulo-endothélial. Cependant, les bactéries restent dans les ganglions ou leur lyse libère de grande quantité d'endotoxines qui passe dans le sang, il s'ensuit des chocs endotoxiniques fréquents et une fièvre rythmée ou en plateau de plus en plus élevée. Les bactéries impliquées sont dites intracellulaires notamment les *Salmonelles* (*Salmonella typhi*) et Brucelles (Brucellose). (Faucher 1997).

⇒ **Septicémie endocarditique:**

Ce type de septicémie survient surtout dans des cas de lésions cardiaques préexistantes (valvulopathie) ou chez les porteurs de prothèses cardiaques ou vasculaires. A la faveur d'une bactériémie le plus souvent d'origine dentaire, le germe arrive au cœur et adhère au sein d'un amas de fibrine et de plaquettes (végétation), à la surface de l'endocarde lésé ou du matériel étranger intravasculaire. A partir de cette végétation (le foyer du germe), les bactéries ou les substances bactériennes sont relarguées dans le sang de façon permanente. La fièvre est peut élevée mais reste permanente. Les bactéries responsables sont les Streptocoques. Les germes constituent au sein de la végétation des micro-colonies peu accessible aux défenses naturelles et aux antibiotiques. De plus ces bactéries bien adaptées au milieu, sont parfois défectives (paroi absente ou anormale), et elles sont difficilement cultivables. (Faucher 1997).

⇒ **Autre mécanismes physiopathologiques de septicémie:**

Les mécanismes précédents sont classiques et ne recouvrent pas toutes les situations possibles. En milieu chirurgicale, en pathologie digestive ou obstétricale et chez les patients immunodéprimés les septicémies peuvent revêtir des aspects particuliers (inoculum massifs et poly microbiens, non réponse au traitement). (Faucher 1997).

→ **La septicémie néonatale:**

Chez le nouveau né, la contamination se fait lors de la naissance ou plus rarement par voie transplacentaire. Les germes en cause sont: *Streptococcus agalactiae*, *E.coli K1*, *Listeria monocytogenes*. (Faucher 1997).

→ **Chez l'immunodéprimé:**

Les germes en cause sont très variables selon l'immunodépression. Il s'agit souvent des germes opportunistes (*Pseudomonas*, *mycobactéries*). (Faucher 1997).

→ **Chez les porteurs de matériels prothétiques (cathéter veineux, sondes):**

Les germes en cause sont souvent des *Staphylococcus aureus* et non doré qui ont colonisées le matériel étranger. (Faucher 1997).

## II- L'hémoculture:

### 1-Définition:

Une hémoculture est un examen sanguin essentiel en maladie infectieuse. Il consiste en un prélèvement de sang veineux, qui est ensuite mis en culture afin d'y rechercher des germes. Il est effectué si possible avant la mise en route d'une antibiothérapie. On réalise en général 3 prélèvements différents, à quelques heures d'intervalle, effectués si possible au moment d'un pic d'hyperthermie ou d'hypothermie ou lors de frissons qui signent une décharge bactériémique.

Il permet donc de poser un diagnostic pour savoir si l'état est septicémique ou bactériémie.

### 2-Objectifs:

L'hémoculture permet :

- ⇒ De poser un diagnostic de septicémie, ou de bactériémie
- ⇒ D'identifier le(s) germe(s) responsable(s)
- ⇒ Affirmer une infection sanguine généralisée
- ⇒ De réaliser un antibiogramme pour orienter le médecin dans la prescription d'un traitement antibiotique efficace. (Houidi 2005)

### 3-Indication :

L'hémoculture de fait sous prescription médicale dans le cadre de bactériémie, des maladies infectieuses septicémiques, des septicémies par thrombophlébite, et en générale dans tous les cas ou il ya:

- ⇒ Hyperthermie – hypothermie : En général quand les patients ont une hypothermie révélatrice d'un bacille Gram (-)
- ⇒ Pic fébrile, frissons : Tremblement inégal et irrégulier accompagné d'une sensation de froid pouvant témoigner d'une décharge bactérienne)
- ⇒ Bilan infectieux.
- ⇒ Toute fièvre non expliquée + signe clinique.
- ⇒ Toute fièvre non expliquée isolée.

- ⇒ Maladie terminale chez un immunodéprimé
- ⇒ Toxicomanie par voie veineuse
- ⇒ Devant un choc septique
- ⇒ Tout opéré récent présentant de la fièvre
- ⇒ Maladies d'Oesler (endocardite),
- ⇒ Tout patient porteur d'un cathéter périphérique ou central, sonde ou prothèse (Houidi, 2005)

#### 4-Contre indication:

L'hémoculture ne se pratiquant pas dans les cas suivants:

- ⇒ Bras perfusé
- ⇒ Présence d'une fistule artéro-veineuse
- ⇒ Quand le patient est sous traitement antibiotique (Houidi 2005)

#### 5-Agents étiologiques :

Un grand nombre de microorganismes peuvent être agents de bactériémie, mais leur incrimination n'est pas toujours facile. On distingue :

##### 5-1-Les agents pathogènes spécifiques :

Leur isolement d'une hémoculture établit le diagnostic d'emblée car ils sont associés à une pathologie infectieuse donnée: C'est le cas des Salmonelles Majeures (*S.typhi* et *S.paratyphi*), des Brucelles, du Méningocoque et du Pneumocoque.

##### 5-2-Les agents pathogènes opportunistes :

Leur incrimination s'appuie sur la fréquence de leur isolement en hémoculture, la ou les portes d'entrée potentielles dans l'organisme et le statut immunitaire du patient. En effet, ces agents font partie de la flore normale du corps humain et animal et sont même parfois des saprophytes de l'environnement.

Leur caractère ubiquitaire en fait de fréquents contaminants des milieux de culture et le microbiologiste ne peut statuer sur leur rôle dans le syndrome infectieux sans l'aide d'une fiche de renseignements cliniques détaillée.

On suspecte souvent une ou plusieurs portes d'entrée, en particulier en milieu hospitalier.

On peut distinguer entre autres, les Staphylocoques (espèce *aureus* ou à coagulase négative), les Entérocoques mais beaucoup plus souvent des bacilles à gram négatif tels les Entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

De même, on assiste depuis une vingtaine d'années à l'émergence croissante en milieu hospitalier, de microorganismes appelés nouveaux agents d'infection nosocomiale, connus jusqu'alors comme de banales bactéries de l'environnement : Nous citerons *Acinetobacter baumannii* et *Stenotrophomonas maltophilia*. ..... [Site]

Produced with ScanTOPDF

# **Chapitre II:**

# **Matériel**

**et**

# **méthode**

Produced with ScanTOPDF

La partie pratique de ce travail a été réalisée dans le laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Zohr et au laboratoire de microbiologie du département de biologie à l'université de 08 Mai 1945 à Guelma.

## **1. Echantillonnage :**

### **Les échantillons biologiques :**

Dans notre travail, on utilise le sang qui est un liquide biologique stérile dans l'état normale, le prélèvement se fait chez les patients hospitalisés il faut environ 20 ml de sang qu'est recueilli dans deux flacons différents (aérobie et anaérobie) de type Castaneda , presque tous ont un double système de fermeture constitué d'un bouchon externe rigide , généralement à vis et d'une capsule interne souple et stérile qui permettra la pose par perforation d'une tubulure à double aiguille ,type perfusion destinée à recueillir le sang . (Marchal et al, 1987).

## **2-Technique d'analyse:**

### **2-1-Le prélèvement du sang pour hémoculture:**

Le prélèvement de sang veineux se fait le plus souvent dans la veine située au pli du coude.

Ce prélèvement doit être fait dans des conditions d'asepsie rigoureuses, au risque de fausser l'examen en contaminant le sang avec des germes parasites (par exemple si des germes se trouvant sur la peau se retrouvent dans l'échantillon, on parlera de souillure ou de contamination).

Le sang prélevé estensemencé dans des flacons spéciaux, deux types de flacons sontensemencés, un flacon aérobie et un flacon anaérobie, permettant ainsi de détecter les germes aérobies et anaérobies.

→ **Réalisation du soin:**

- Vérifier la prescription médicale.
- Prévenir le patient.
- Installer le matériel après vérification des dates de péremptions et de l'intégrité des emballages.
- Installation sur une surface propre et désinfectée au préalable.
- Installer le rétroforme et le container à déchets contaminés piquants loin du matériel propre.
- Respecter le triangle d'hygiène, de sécurité et d'ergonomie : Propre (matériel) – Patient – Sale (poubelles).
- Effectuer un lavage simple des mains ou effectuer un traitement hygiénique des mains par frictions avec une solution hydro-alcoolique : hygiène des mains.
- Ouvrir le champ des gants stériles et y déposer aseptiquement l'aiguille épicerânienne.
- Ouvrir aseptiquement les paquets de compresses et les imbiber avec le savon antiseptique (mettre un peu de sérum ou eau sur le savon antiseptique afin de le diluer), le sérum physiologique, l'antiseptique dermique, laisser un paquet de compresses sèches.
- Ces étapes doivent être réalisées par un infirmier.

⇒ **Choix de la zone de prélèvement :** Les zones de prélèvement sont:

- a) Prélèvement sanguin par ponction veineuse.
- b) Prélèvement sanguin par ponction artérielle.
- c) Prélèvement sanguin sur un cathéter central ou une chambre implantable.
- d) Prélèvement sanguin sur un cathéter artériel

→ **Volume de sang à prélever :**

Pour ce qui est du volume de sang à prélever, il doit être de 20 ml par flacon chez l'adulte, de 2 à 5 ml chez l'enfant et de 1 ml chez le nouveau-né et le nourrisson. Certains auteurs recommandent d'adapter le volume de sang prélevé au poids de l'enfant.

Chez le jeune enfant, on préférera les prélèvements veineux aux ponctions capillaires des micro-hémocultures, ces dernières favorisant les contaminations et ne ramenant qu'un échantillon très réduit de sang.

Le volume du sang à prélever a une très grande importance dans la positivité des flacons d'hémoculture dont un volume de 20ml au pourcentage de la positivité de 30% comparativement à un volume de 10ml. Cette quantité diffère en fonction de l'âge du patient.

→ **Les milieux de cultures:**

Le milieu pour hémoculture est classiquement un bouillon conditionné en flacon sous pression réduite, et que l'on inocule avec le sang du patient à travers un opercule en caoutchouc. On trouve dans le commerce divers modèles de flacons d'hémoculture, les uns pour incubation conventionnelle, les autres spécifiques pour incubateurs automatisés.

En incubation classique, diverses options sont proposées :

- La présentation Biphase (phase solide - phase liquide) retrouvée dans le modèle CASTANEDA (BIORAD) ou HEMOLINE (BIOMERIEUX).
- la présentation monophasique proposée par les mêmes fournisseurs et destinée à la détection des bactéries anaérobies strictes : il s'agit d'un bouillon de culture SCHAEGLER conditionné sous vide.
- Le bouillon pour hémoculture de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Classiquement, tout bouillon pour hémoculture est un bouillon nutritif enrichi de facteurs de croissance : Peptones de Caséine et de Gélatine, Extraits de levure, NAD et Hémine, Vitamines B6, K3, Cystéine. L'atmosphère à l'intérieur du flacon est faite de CO<sub>2</sub>. L'anticoagulant est le SPS.

Pour garantir la qualité de l'hémoculture, il faudrait que le milieu jouisse de certaines caractéristiques :

- une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> à l'intérieur du flacon, nécessaire à la culture de *Brucella*, *Neisseria*, *Haemophilus*...
- l'anticoagulant utilisé ne doit pas exercer d'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne : En général, on utilise le SPS ou Poly Anéthol Sulfonate de Sodium à une concentration de 0.025%, car il inhibe les effets antibactériens du sérum et des phagocytes.

- on peut aussi trouver dans les flacons d'hémoculture, des additifs exerçant un effet favorable sur la croissance de certaines bactéries exigeantes (ex. l'Hémine favorise le développement des Hémophilus)

On associe systématiquement 2 flacons pour chaque hémoculture réalisée :

- un flacon aérobie type Cœur-Cervelle, mono ou biphasique ;
- un flacon anaérobie à base de bouillon Schaedler enrichi en hémine et en vitamine K3, (site)

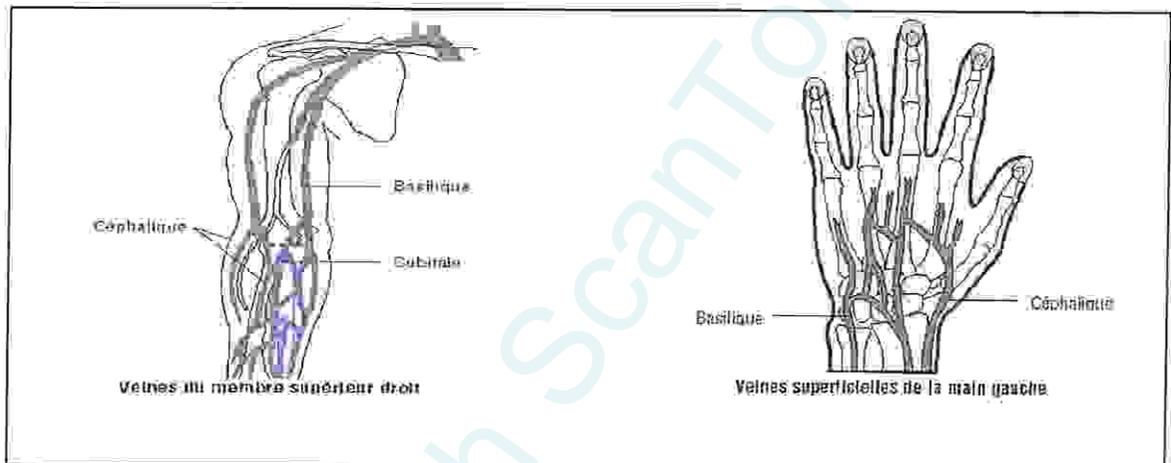


Fig 1. Le choix du point de prélèvement

### 2-2-L'acheminement au laboratoire :

Les flacons d'hémoculture sont correctement étiquetés avec nom, prénom du malade, service d'hospitalisation, date, heure du prélèvement et température du patient au moment de l'hémoculture.

Ils sont rapidement acheminés au laboratoire d'analyse, de préférence enveloppés dans du coton afin de les maintenir à une température proche de celle de l'organisme. Ils sont immédiatement placés à l'étuve à 37°C. Une fiche de renseignements cliniques doit impérativement accompagner les flacons vers le laboratoire. Le clinicien doit y mentionner, à côté des renseignements de base : nom, prénom, âge, service d'hospitalisation, le ou les diagnostics évoqués, particulièrement l'Endocardite infectieuse, la Brucellose ou la Leptospirose de même que le traitement antibiotique en cours ou datant de moins de 7 jours. (site)

### 2-3-Suivit des flacons d'hémoculture :

⇒ **Méthodes conventionnelles de la détection des hémocultures positives:**

Au laboratoire, les flacons sont examinés chaque jour à partir de la 6<sup>ème</sup> heure d'incubation, à la recherche d'un signe de culture.

La surveillance des flacons est visuelle, basée sur la recherche d'un trouble, d'un voile en surface, d'une hémolyse, d'un coagulum, de dépôts blanchâtres floconneux au fond du flacon ou de particules adhérentes sur sa paroi interne.

En cas de flacon biphasique (CASTANEDA), l'apparition de colonies sur la paroi gélosée pose le diagnostic d'hémoculture positive. (site)

**Tabl : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité**

Aspect macroscopique	Bactérie en cause
Turbidité	Bacille à Gram-, aérobies
	<i>Staphylococcus sp</i> <i>Bacteroides sp</i>
Hémolyse	<i>Streptococcus sp</i>
	<i>Staphylococcus sp</i>
	<i>Listeria monocytogenese</i>
	<i>Clostridium sp</i> <i>Bacillus sp</i>
Production de gaz	Bactéries aéroanaérobies ou anaérobies strictes
Coagulum	<i>Staphylococcus aureus</i>
Colonies au fond du flacon	<i>Nocardia sp</i>
	<i>Streptococcus sp</i>

**⇒ Détection automatisée des hémocultures positives:**

Des automates permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générés lors de la croissance bactérienne ( $\text{CO}_2$ , ions  $\text{H}^+$ , variations du potentiel redox du milieu). (site)

**▪ Agros Sanofi-Pasteur:**

Cet appareil mesure la production du  $\text{CO}_2$  à travers le verre par spectrophotométrie. Le dosage du  $\text{CO}_2$  se fait après transfert du flacon vers un plateau de lecture, la mesure est prise pendant trois secondes dans le moment de rotation du flacon. (site)

**▪ Bact Alert Organon Technica:**

Le principe de détection de cet appareil est d'incorporer dans chaque flacon colorimétrique "  $\text{CO}_2$  Sensor" de couleur verte. Le sensor est séparé du boillon par une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que le  $\text{CO}_2$ . La production du  $\text{CO}_2$  entraîne une diminution du pH et le sensor devient jaune. Le virage de couleur est interprété par réflectométrie, chaque lecture compare la variation de couleur à la précédente, chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture. (site)

**▪ Bactec Becton Dickinson:**

Le principe est également basé sur l'existence d'un sensor sensible à la variation du pH, cette décroissance est mesurée par une coloration fluorescente elle-même est mesurée par une photodiode. (site)

**▪ Vital Biomérieux:**

Dans les flacons se trouve une molécule fluorescente à l'état natif qui voit sa fluorescence s'éteindre en présence de phénomène biologique produit par la croissance bactérienne. C'est la technique HFT (Homogenous Fluorescence Technology). Cette molécule fluorescente n'est pas seulement sensible au  $\text{CO}_2$ , la croissance est aussi détectée par variation du pH et modification du potentiel redox du milieu.

Chaque flacon dispose de sa propre cellule de lecture équipé d'une diode d'excitation émettant une lumière verte. La lumière rouge émise est filtrée et transmise par une fibre optique vers un compteur de photons. (site)

Ces automates présentent des avantages certains:

- Lecture multiple ou même en continue au cours des heures qui suivent le prélèvement;
- Incubation sous agitation;
- Détection standardisée des hémocultures positives.

Globalement, ces méthodes permettent un rendu beaucoup plus précoce des résultats à la fois grâce à la vitesse de la croissance des bactéries dans ces conditions, à la sensibilité de la détection et la multiplicité des lectures. La qualité des milieux utilisés permet l'isolement des bactéries autrefois rarement découvertes dans des hémocultures (*Hémophilus* et *Compylobacter*). Ces automates sont cependant encore onéreux et ne sont utilisés que par les laboratoires pratiquant un nombre important des hémocultures. (Fauchère 1997)

#### **2-4-Repiquage sur milieux solides:**

Les flacons d'hémoculture ne sont jamais ouverts ; l'isolement et l'identification des agents infectieux sont réalisés à partir d'un échantillon prélevé par ponction à la seringue, de chaque flacon.

Toutes les manipulations se font sous hotte bactériologique à flux laminaire. Le port d'un masque et de gants est indispensable vu le risque de transmission au manipulateur, de certains germes dangereux (exemple *Brucella*).

Au moindre signe de culture, on effectue une coloration de Gram sur un échantillon prélevé par ponction aseptique de l'opercule à l'aide d'une seringue stérile.

L'examen direct ainsi réalisé va permettre de reconnaître la morphologie de l'agent bactérien présent dans le flacon ce qui peut orienter l'identification du germe:

Cette information est immédiatement transmise au clinicien car elle peut lui permettre d'instituer un traitement antibiotique non encore entrepris ou encore de rectifier une antibiothérapie probabiliste.

Des prélèvements d'échantillons à partir de chaque flacon sontensemencés parallèlement sur des milieux de culture. On les effectue à la moindre suspicion de culture, de façon systématique à 18-24 h, 5-6<sup>ème</sup> jour et à la fin de la période de surveillance des flacons, qui est généralement de 10 à 15 jours. Certains germes cultivent sans trouble du bouillon, d'autres risquent de s'autolyser avec le temps.

Ces milieux de culture sont incubés sous CO<sub>2</sub> pendant 48 h et examinées à la 24<sup>ème</sup> heure puis à la 48<sup>ème</sup> heure.

Pour les échantillons 1, 4 et 5 on a observé le même aspect macroscopique des flacons ; donc on aensemencé les milieux suivants: la gélose nutritive comme milieu ordinaire, la GSC comme milieu enrichit, et Chapman comme milieu sélectif par la méthode des stries par quadrant dans le but d'avoir des colonies isolées, puis incubé à 37°C pendant 24H.

Pour les échantillons 2 et 8 on a détecté le même aspect macroscopique des flacons alors, on aensemencé les milieux de culture suivants, la GN comme milieu ordinaire, la GSC comme milieu enrichit, l'Hectoene et le Mac Conkey comme milieux sélectif, toujours par la méthode de stries par quadrant pour avoir des colonies isolé, puis incubé à 37°C pendant 24H.

Pour les échantillons 3, 6, 7et9 on a observé le même aspect macroscopique des flacons donc on a repiqué les milieux de cultures suivant; la GN comme milieu ordinaire, la GSC comme milieu enrichit, et Chapman comme milieu sélectif par la méthode des stries par quadrant dans le but d'avoir des colonies isolées, puis on a incubé à 37°C pendant 24H; mais pour l'échantillon N°7 on a observé un aspect macroscopique des flacons différents aux échantillons précédent( 5,6,8) ,alors on aensemencé les milieux de cultures suivants; la GN comme milieu ordinaire, la GSC comme milieu enrichit.

- ⇒ L'ensemencement par quadrant se réalise en suivant les étapes suivantes:
- L'inoculum est déposé près de bords de la boîte de Petrie.
  - Par une pipette Pasteur on fait étaler le dépôt par des stries très séries jusqu'on atteindre le diamètre horizontale de la boîte, on a donc recouvert les quadrants 1 et 2.
  - Flamber la pipette Pasteur et fait tourner la boîte de  $90^\circ$  et on réalise la même opération.
  - La semence précédemment déposée sur le quadrant 2 est étalée sur le quadrant 3.
  - On fait tourner la boîte de  $90^\circ$  et la semence du quadrant 3 est épuisée sur le quadrant 4.
  - Après culture on obtient en 4 des colonies isolé, facile à prélever.

Tab2: Hémocultures spécifiques

Agents recherchés	Milieux de culture adéquate	T° et durée d'incubation
<i>Brucella sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit	37°C 48h-72h sous 5%CO <sub>2</sub>
<i>Compylobacter sp</i>	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit	37°C 3-4 jours sous 5%CO <sub>2</sub> Microaérophilie
<i>Legionella sp</i>	BCYE	37°C 15jrs 5%CO <sub>2</sub>
HACEK	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit +PVX	37°C 4jrs sous 5%CO <sub>2</sub>
<i>Abiotrophia sp</i> <i>Granulicatella sp</i>	Columbia + sang frais+strie de Staph (Satellitisme) Autres : Columbia +sang frais+ 0,001% Pyridoxal Enrichissement sur TODD HEWITT + PVX	37°C 3jrs S/CO <sub>2</sub>
<i>Bartonella quintana</i> ou <i>Bartonella henselae</i>	Prélèvement de sang sur tube hépariné Utilisation du système de centrifugation- lyse Culot de centrifugation mis en culture sur Columbia +sang frais de mouton ou de lapin Mise en culture sur lignée cellulaire (cellules endothéliales).	37°C 6 semaines 5% CO <sub>2</sub> 37°C 10 jrs /CO <sub>2</sub>
Leptospires	Prélèvement de sang sur tube hépariné Milieu au Tween + Albumine en tubes	30°C à l'obscurité 2 mois
Mycobactéries	Hémoculture en Bact/alert- flacon d'hémoc. spécifique pour Mycobactéries	
Mycoplasmes <i>Ureaplasma</i>	Culture en bouillon PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) ou en gélose A3	37°C Microaérophilie 3 jours

**2-5-Identification :****2-5-1-l'étude microscopique:****2-5-1-1-L'état frais:**

On dépose sur une lame propre et stérile une goutte d'eau distillée stérile puis on ajoute une colonie prélevée à partir de la culture et on homogénéise le tout et on le recouvre par une lamelle de façon longitudinale afin d'éviter la formation de bulle d'air puis observer au microscope à l'objectif (x40) pour avoir si la mobilité de la bactérie à étudier. (Singleton 2004)

**2-5-1-2-la coloration de Gram:****▪ Préparation des frottis:**

Après avoir stérilisé la lame, on prélève une ou plusieurs gouttes de la suspension bactérienne et on la met sur la lame puis on étale les gouttes sur la lame et puis on les sèche à l'aide du bec Bunsen et on obtient notre frottis.

**▪ Procédure:**

- Le frottis fixé à la chaleur est coloré par le violet de gentiane (cristal violet) pendant une minute;
- Il est ensuite rincé à l'eau courante;
- Traité pendant une minute par la solution de lugole( solution aqueuse d'iode et d'iodure de potassium);
- Puis on soumet le frottis coloré à une étape de décoloration on le traite avec l'éthanol (95%) pendant 1 à 3 secondes seulement;
- Rincer à nouveau à l'eau courante;
- On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine basique diluée;
- Après Rinçage à l'eau courante, on sèche le frottis au buvard,
- En fin on met une goutte d'huile cèdre et on examine à l'objectif à immersion (grossissement x1000). (Singleton 2004)

## 2-6-Les tests d'identification biochimique:

### 2-6-1- Fermentation du mannitol:

Cette attaque permet avec certaine réserve de distinguer *staphylococcus aureus* actif en aérobie et anaérobie, *staphylococcus saprophyticus* actif en aérobie et *staphylococcus epidermidis*, qui observé par un virage de couleur vers le jaune sur milieu Chapman (pili et al, 1987).

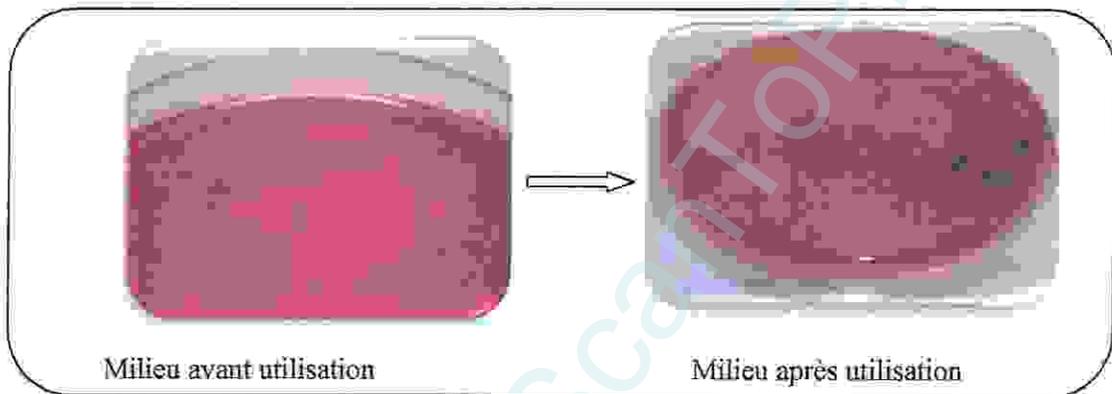


Fig 2: la fermentation du mannitol

### 2-6-2-Recherche de l'oxydase:

La recherche de la phénylène diamine oxydase est un des critères les plus employés pour l'identification des bactéries surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine. Ce dernier, est mauve clair et en présence de l'enzyme, il libère un composé mauve foncé.

- **La méthode**

Déposer sur une lame propre les disques d'oxydase (pré-imprégné par le réactif), imbibés avec une goutte d'eau distillée ou eau physiologique stérile.

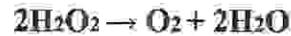
Prélever une colonie de la souche à tester à l'aide d'une pipette pasteur stérile et l'étaler sur le disque.

- **Lecture**

Une réaction positive se manifeste par changement de couleur de disque vers le mauve foncé. (Singleton 2004)

### 2-6-3- Recherche de la catalase :

Ce test permet de montrer la présence ou l'absence de catalase. Cette enzyme permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) résultant de l'oxydation des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe, selon la réaction suivante :



- **La méthode:**

Déposer dans une lame propre, une goutte d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), puis la mettre en contact avec des colonies bactériennes prélevées par une pipette pasteur stérile.

- **Lecture**

Une réaction positive se manifeste par un dégagement immédiat de bulles gazeuses. (Singleton 2004)

### 2-6-4- Recherche de la Coagulase :

Ce test permet de montrer la présence ou l'absence de l'enzyme Coagulase.

#### La méthode

Sur un tube d'hémolyse stérile on met un volume de 0,5ml de la suspension bactérienne de la souche à tester, puis on ajoute un volume de 0.5ml du plasma humain, ensuite incubé à 37°C pendant 4h et 24h.

#### Lecture

Après l'incubation on va voir au niveau du tube un coagulum de couleur blanc, donc la lecture après 4h et 24h. (Singleton 2004)

### 2-6-5- Recherche de la DNase :

Ce test permet de montrer la présence ou l'absence de l'enzyme DNase. Cette enzyme permet la dégradation de l'ADN.

#### La méthode

Sur une boîte de pétri stérile contenant le milieu de culture DNase, on fait l'ensemencement de trois souches différents, la souche à tester, *E.coli* comme témoin négatif, et *Staphylococcus aureus* comme témoin positif, puis l'incubation à 37°C pendant 24h.

Après l'incubation on verse quelques ml d'HCl de concentration 1 mol par litre sur la boîte pendant 2 à 3 secondes et jet le reste .

### Lecture

Quant on va voir une résistance de la souche à tester comme la souche *Staphylococcus aureus* c'est-à-dire DNase positif, et quant on va voir une disparition de la souche à tester comme la souche *E.coli* c'est-à-dire DNase négatif, (pili et al,1987).

### 2-6-6-les testes de la galerie API20E:

#### Présentation de la galerie:

Cette galerie est constitué de 20 micro tubes (tubules) prêts à l'emploi permettant de réaliser 20 tests biochimiques afin d'identifier des bacilles Gram – appartenant à la famille des *Entérobactériaceae*.

#### ▪ Préparation de l'inoculum:

→ on prélève une colonie par pipete Pasteur et on la met dans un tube contient de l'eau distillée stérile et on homogénise pour obtenir une suspension bactérienne de 0,5 MF

#### ▪ Ensemencement de la galerie API 20 E:

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air.
- Ajouter la vaseline ou la paraffine pour les testes souligné (pour la création d'une atmosphère anaérobie stricte (ADH LDC ODC H<sub>2</sub>S URE)).
- Remplis les cupules et les tubules des testes aérobies strictes (Cit, VP, Gel).
- Remplir les tubules seulement dans les testes aéroanaérobies facultatif.
- Réunir le fond API et couvercle et incuber à 37°C pendant 24h (le fond doit être remplis avec quelque gouttes d'eau pour crié une atmosphère humide).
- Après incubation on ajoute des réactifs pour les testes: TDA (réactif TDA), IND (kovacs), VP (VP1, VP2)
- Enfin on lit les tests positif et les tests négatifs et on forme le code d'identification qu'on le reporte dans un catalogue qui contient les espèces et on voit a quelle espèce revient notre code (Delarras ,2007)

Tab3: Extrait du tableau de lecture de la galerie API20E (Delarras 2007)

Tests	Composants actifs (réactions/enzymes)	Résultats	
		Négatif	Positif
ONPG	2-nitrophényl-B-D-galactopyranoside (B-galactosidase)	Incolore	Jaune (et coloration jaune légère)
ADH	L-arginine (arginine dihydrolase)	jaune	Rouge/Orange
LDC	L-lysine (lysine décarboxylase)		
ODC	L-ornithine (ornithine décarboxylase)		
CIT	Trisodium citrate (utilisation)	Vert-pal/jaune	Bleu-vert/bleu (dans la cupule)
H <sub>2</sub> S	Sodium thiosulfate (production d'H <sub>2</sub> S)	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée(Uréase)	jaune	Rouge/Orangé
TDA	L-tryptophane (tryptophane désaminase)	jaune	Marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane (production d'indole)	Incolore Vert-pal/jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate (production d'acétoïne)	Incolore	Rose/rouge (après 10minutes noter négatif)
GEL	Gélatine d'origine bovine (gélatinasse)	Pas de diffusion	Diffusion de pigment noir
GLU	D-glucose	Bleu/bleu-vert	Jaune
MAN	D-mannitol		
INO	Inositol		
SOR	D-sorbitol		
RHA	D-rhamnose		
SAC	D-saccharose		
MEL	D-melibiose		
AMY	Amygdaline		
ARA	L-arabinose		

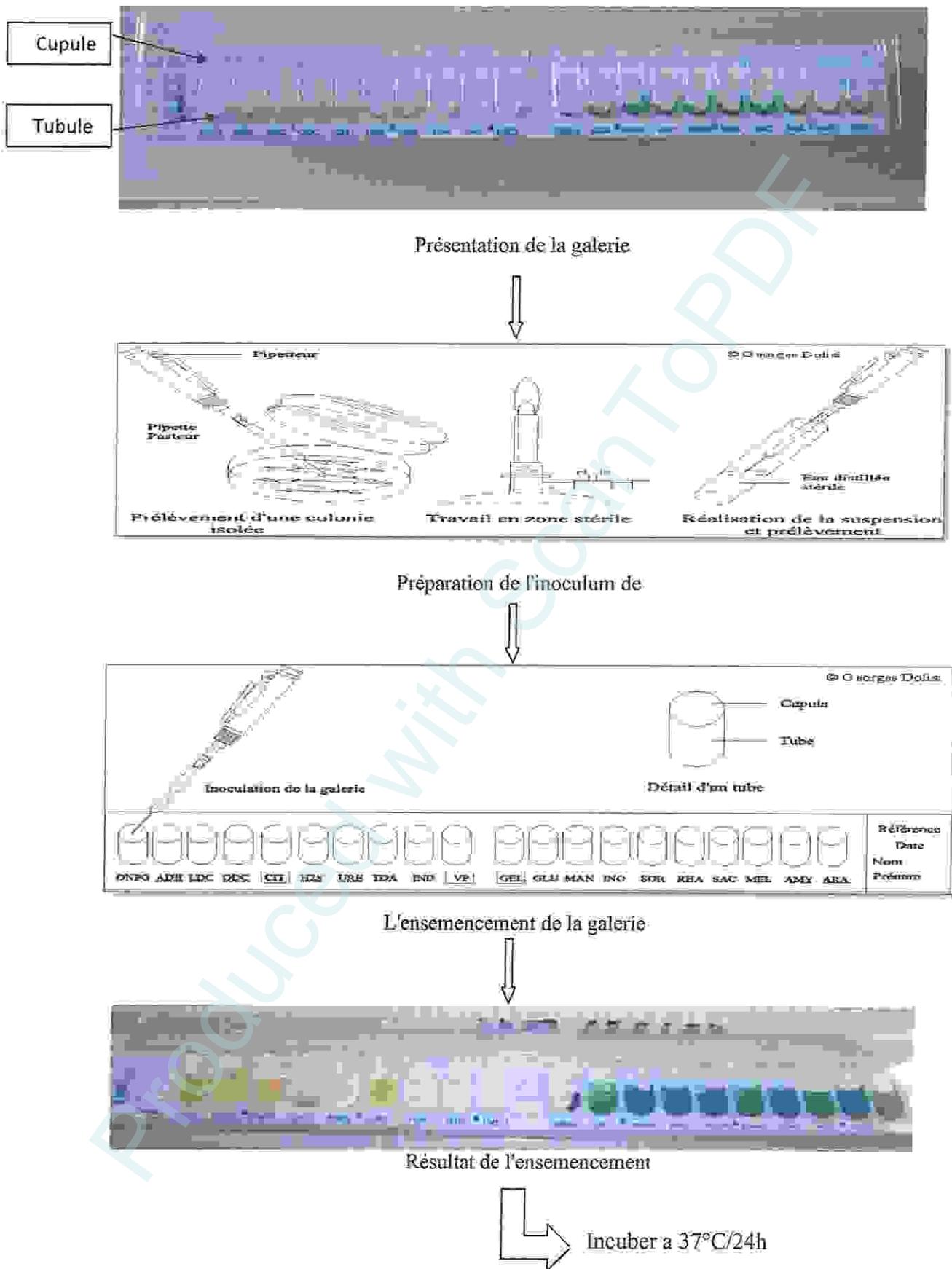


Fig 3: les étapes de l'ensemencement de la galerie API20E

Tab4: les tests biochimiques réalisés pour les échantillons étudiés

Echantillons / Teste	Coagulase	catalase	oxydase	DNase	mannitol	API 20E
Echa 1	+	+	+	+	+	-
Echa 2	-	-	+	-	-	+
Echa 3	-	-	-	-	-	-
Echa 4	+	+	+	+	+	-
Echa 5	+	+	+	+	+	-
Echa 6	-	-	-	-	-	-
Echa 7	-	-	-	-	-	-
Echa 8	-	-	+	-	-	+
Echa 9	-	-	-	-	-	-

### 2-7-L'antibiogramme:

#### ▪ Principe:

L'établissement de l'antibiogramme est la dernière étape de l'étude, elle sert à déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries aux ATB; ce test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller- Hinton.

#### ▪ Technique:

- Prendre la gélose de Mueller Hinton, vérifier l'absence d'eau à la surface ; s'il y en a, laissé sécher.
- Onensemence la gélose MH a partir d'une suspension bactérienne de n colonies soit à l'aide d'un écouvillon, soit par inondation
- Laisser sécher de 3 à 5 minutes.
- Appliquer les disques d'antibiotiques (ATB) à l'aide d'un distributeur automatique.
- Incuber 16 à 18h, à 35°C (au maximum 24h).

▪ **Après incubation:**

- Mesure les diamètres des auréoles (zones d'inhibition de croissance de la souche microbienne).
- Comparer les résultats obtenus aux valeurs critiques figurants dans les tableaux d'annexe.
- Classer les bactéries dans l'une des catégories : sensibles, intermédiaires et résistances; la mesure du diamètre d'inhibition représente la valeur de la CMI (concentration minimale d'inhibition) de l'antibiotique.
- Seul les antibiotiques aux quelles la souche bactérienne est sensible peuvent être efficace chez le patient. L'utilisation d'un antibiotique auquel la souche bactérienne est résistante conduirait à un échec thérapeutique chez le patient. de même L'utilisation d'un antibiotique auquel la souche bactérienne est intermédiaire, c'est-à-dire dans la zone d'incertitude entre sensible et résistante, ne permet pas de prévoir le succès ou l'échec du traitement. l'interprétation des antibiogrammes s'avère parfois délicate. (C.Delarras 2007)

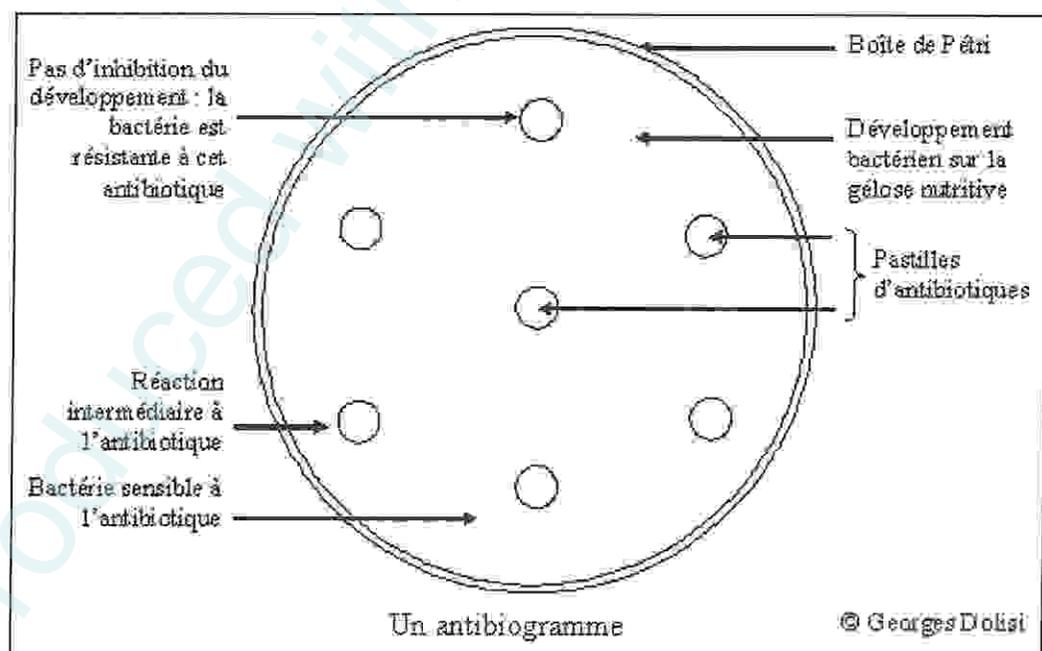


Fig 4: présentation schématique d'un antibiogramme

# **Chapitre III:**

## **résultat**

### **et**

## **discussion**

Produced with SCANTOPDF

## I-Résultats:

Notre travail est effectué sur 09 prélèvements d'hémoculture dont on a isolé 04 espèces bactériennes a partir de 05 cultures positifs.

### 1- Résultats des prélèvements:

Les flacons des échantillons étudiés après une durée significative d'incubation (période d'incubation durant laquelle apparaissent les premières signes de positivité des flacons) qui dure de 48h à 10 jours. Le tableau suivant résume les résultats obtenus de l'incubation des flacons.

**Tab 5: Etude macroscopique de nos prélèvements.**

patients	Age	Sexe	Nombre des flacons	Aspect macroscopique	Aspect bactériologique
1	19ans	Homme	2/3	hémolyse	Flacon positive
2	80ans	femme	2/3	production de gaz + formation du culot	Flacon positive
3	4ans	Homme	1/3	trouble	Flacon negative
4	9mois	Homme	1/3	hémolyse	Flacon positive
5	11mois	Femme	2/3	hémolyse	Flacon positive
6	18ans	Homme	2/3	trouble	Flacon negative
7	39ans	Femme	2/3	coagulum	Flacon negative
8	75ans	Homme	2/3	trouble	Flacon positive
9	30ans	Femme	1/3	trouble	Flacon negative



Fig 5: les différents aspects macroscopiques des flacons d'hémocultures

## 2- Résultats de l'étude macroscopique et microscopiques:

A partir de l'aspect macroscopique des flacons qui nous oriente aux choix adéquat des milieux pour l'isolement et l'identification des espèces bactériennes présentent dans les flacons. Le tableau suivant résume les résultats de la culture sur milieux gélosés (l'aspect macroscopique des colonies) ainsi que de l'étude microscopique (l'état frais et la coloration de Gram).

Tab 6: Résultat de culture

Echantillons	Milieu de culture	Forme	couleur	Etude microscopique
1	GN Chapman GSC	Des colonies lisses bombées	blanchâtres	Cocci G (+) Immobile
2	GN Mac Conkey Hectoene	Des colonies lisses bombées	blanchâtres	Bacilles et coccobacilles G (-), mobile
4	GN Chapman GSC	Des colonies lisses bombées	blanchâtres	Cocci G (+) Immobile
5	GN Chapman GSC	Des colonies lisses bombées	blanchâtres	Cocci G (+) Immobile
8	GN Mac Conkey GSC	Des colonies lisses bombées	blanchâtres	Bacilles G (-) mobile

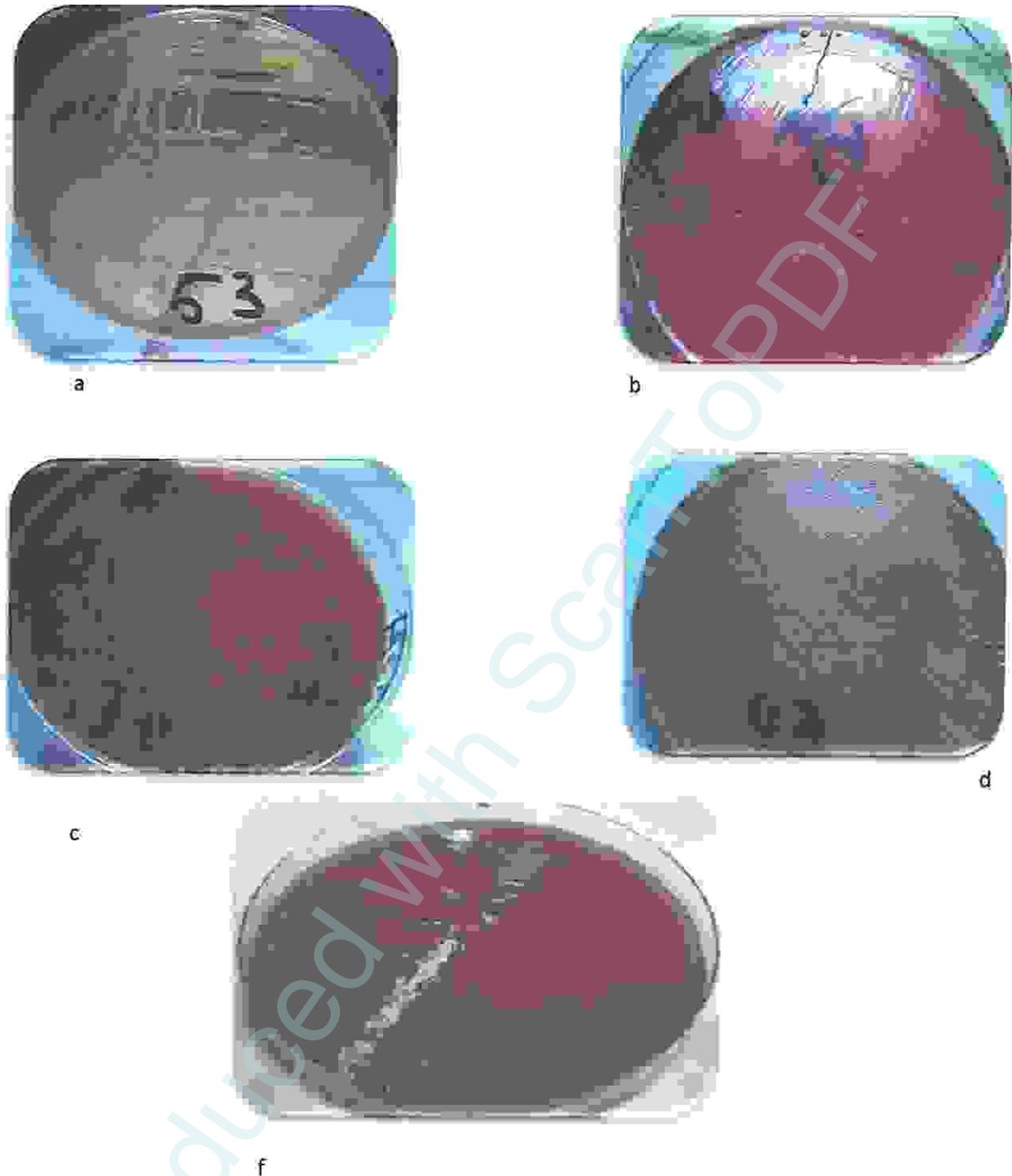


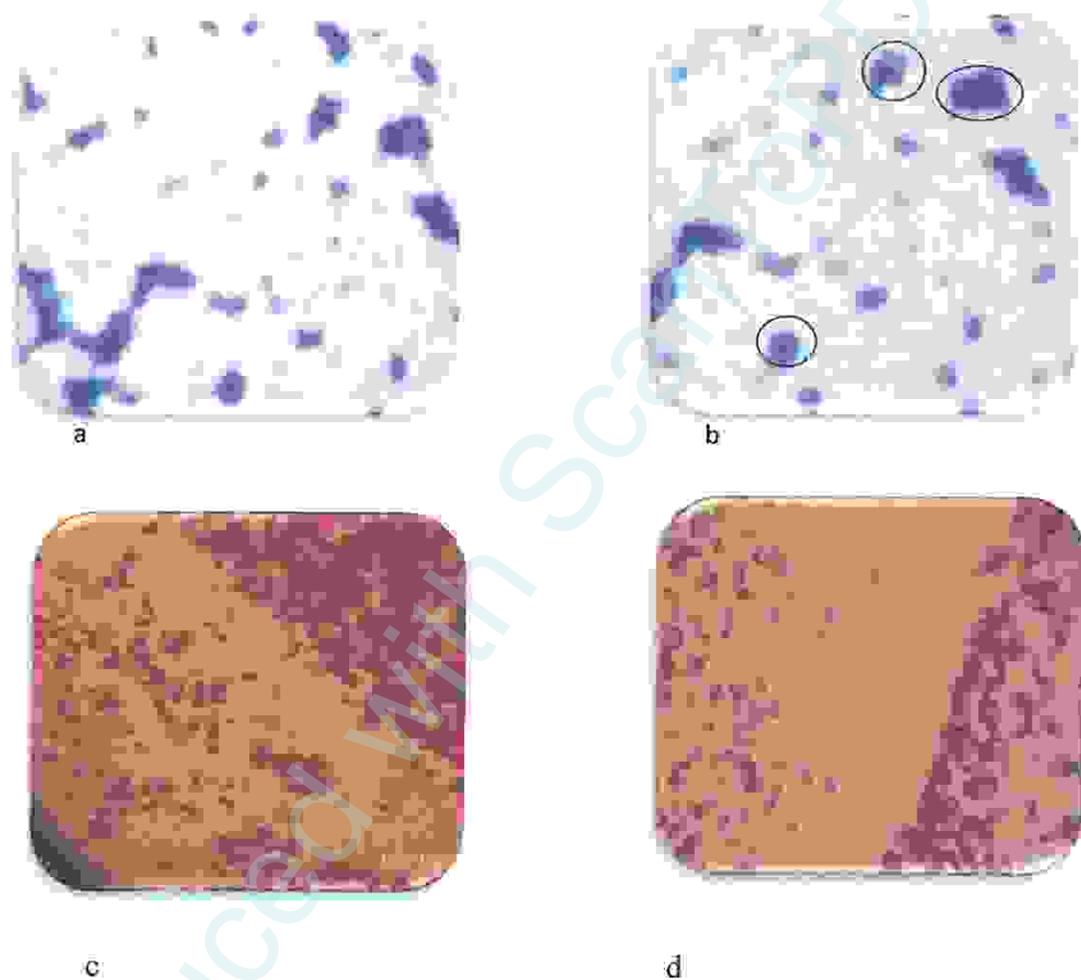
fig 6 : aspect macroscopique des colonies

a: colonies de *Staphylococcus epidermidis* isolé sur Chapman "virage de couleur de milieu".

b: colonies de *Staphylococcus saprophyticus* isolé sur Chapman.

c et d: colonies de *Enterobacter cloacae* isolé sur Hectoene et Mac Conkey.

f: colonies de *Escherichia coli* isolé sur Gélose au sang cuit.



**Fig 7: vue microscopique du résultat de Gram**

a et b: cocci Gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*).

c et d: bacilles Gram négatif (*Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*).

### 3- Résultats de l'identification biochimiques:

Les tests d'identification biochimique (enzymatique) nous ont permis de différencier entre les souches qui ont des caractéristiques de culture semblable telle que *S. saprophiticus* et *S. epidermidis* ainsi que entre *Enterobacter cloacae* et de *E. coli*. Les tableaux suivant résumant les résultats de ces tests.

#### 3-1-Résultat de la galerie API 20E :

Tab 7: résultat de Galerie biochimiques de *Enterobacter cloacae* et de *E.coli*

Résultats		
Tests:	Echantillon 2	Echantillon 8
ONPG	+	+
ADH	+	-
LDC	-	+
ODC	+	+
CIT	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-
URE	-	-
TDA	-	-
IND	-	+
VP	+	-
GEL	-	-
GLU	+	+
MAN	+	+
INO	-	-
SOR	+	+
RHA	+	+
SAC	+	-
MEL	+	+
AMY	+	-
ARA	+	+

fig 8: Résultats de la galerie API 20<sup>E</sup>

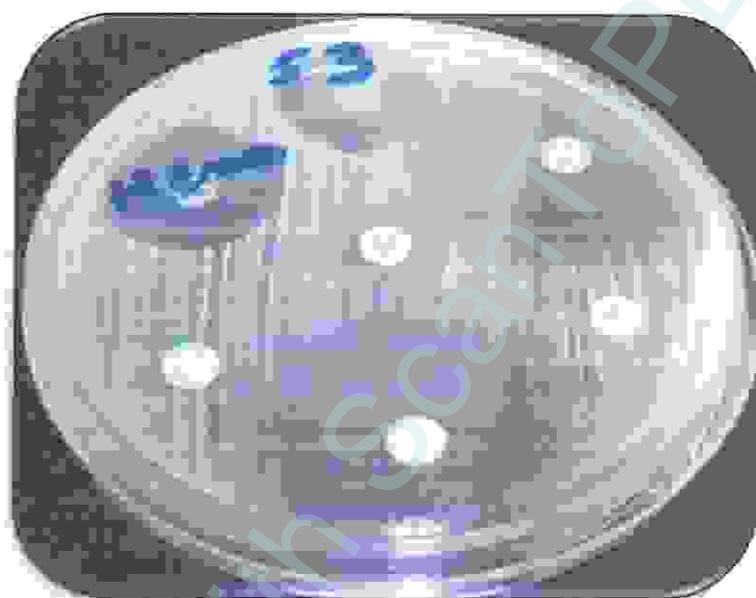
## 3-2- Résultats des tests biochimiques:

Tab 8: Résultats des tests biochimiques

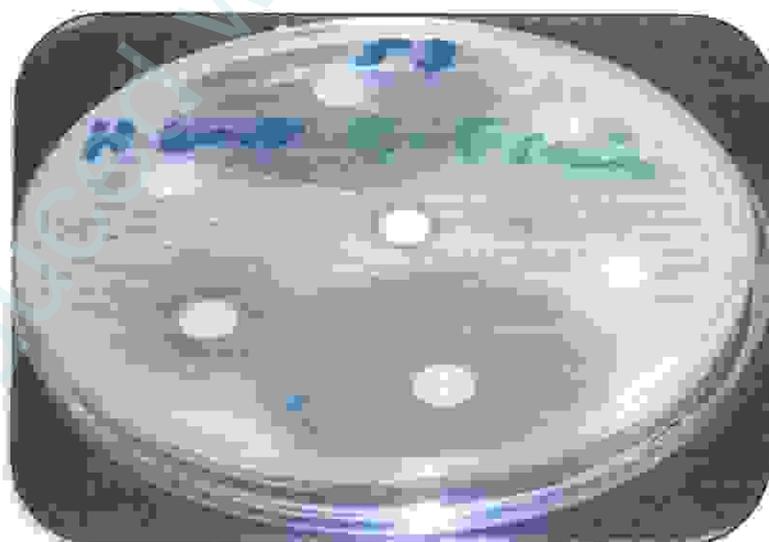
Echantillons tests	mannitol	oxydase	catalase	Coagulase	DNase	API20E (code)	Souche
1	-	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>
2	-	-	-	-	-	3305573	<i>Enterobacter cloacae</i>
3	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
5	-	+	+	-	-	-	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	5144552	<i>E. coli</i>
9	-	-	-	-	-	-	-

#### 4- Résultat de l'antibiogramme:

Après l'identification des souches isolées à partir des échantillons analysés, on doit effectuer un antibiogramme afin d'étudier la sensibilité et la résistance de ces souches vis-à-vis aux différents antibiotiques; les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.



P1



P2

Fig 9: Résultat de l'antibiogramme de la souche *S. epidermidis*

Tab 9: Résultats de l'antibiogramme

Echantillon	Antibiotiques	Zone	Résultat	Souche
1	C	28	Sensible	<i>Staphylococcus saprohyticus</i>
	TE	30	Sensible	
	TEC	36	Sensible	
	N	18	Intermédiaire	
	FF	14	Intermédiaire	
	OX	8	Résistante	
	PT	32	Sensible	
	RA	36	Sensible	
	DO	36	Sensible	
	E	28	Sensible	
	CM	28	Sensible	
	L	34	Sensible	
	P	15	Intermédiaire	
2	C	27	Sensible	<i>Entérobacter cloacae</i>
	N	24	Sensible	
	TM	22	Sensible	
	PIP	28	Sensible	
	P	27	Sensible	
	NI	22	Sensible	
	CIP	31	Sensible	
	CRO	23	Sensible	
	PB	17	Intermédiaire	
	IMP	25	Sensible	
	CAS	25	Sensible	
	AMX	6	Résistante	
	AMC	6	Résistante	
	FS	15	Intermédiaire	

Echantillon	antibiogramme	zone	Résultat	Souche
4	FOX	6	Résistante	S epidermidis
	FF	6	Résistante	
	TE	34	Sensible	
	C	30	Sensible	
	OX	6	Résistante	
	N	22	Sensible	
	TEC	20	Sensible	
	P	6	Résistante	
	CM	6	Résistante	
	E	6	Résistante	
	DO	35	Sensible	
	RA	14	Intermédiaire	
	PT	38	Sensible	
8	C	26	Sensible	<i>Echerichia coli</i>
	WC	34	Sensible	
	CF	32	Sensible	
	AMX	6	Résistante	
	CTX	30	Sensible	
	TPN	36	Sensible	
	SXT	27	Sensible	
	OFX	6	Résistante	
	TN	24	Sensible	
	PB	20	Sensible	
	PIP	18	Intermédiaire	
	CZ	11	Résistante	
	F	22	Sensible	

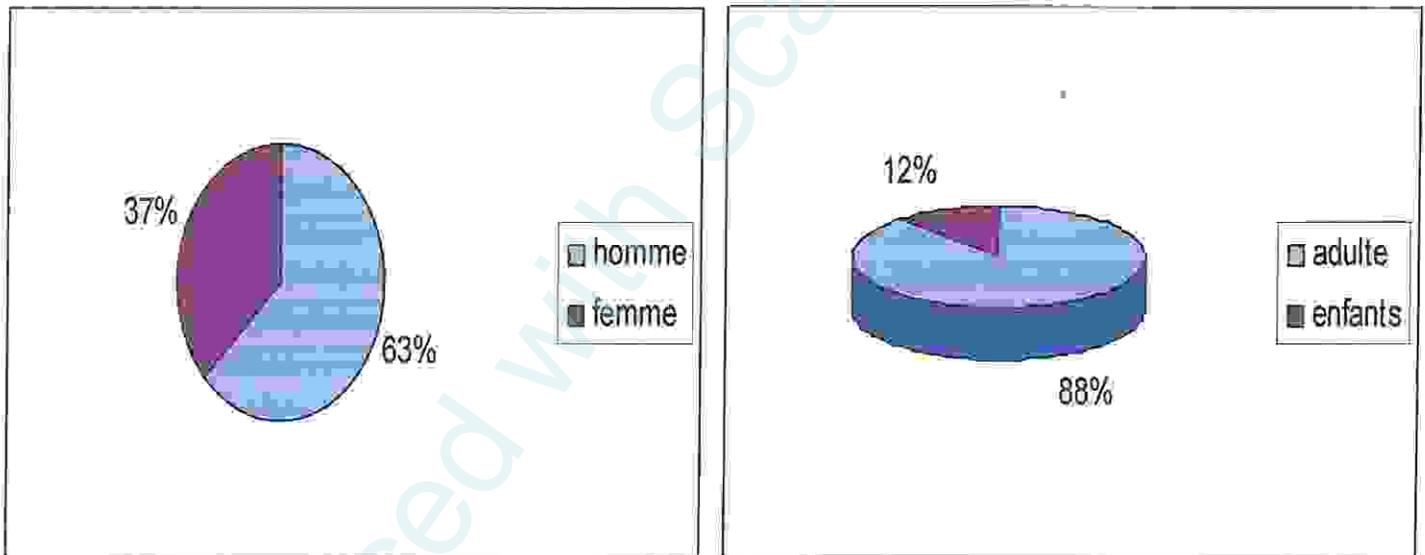
## 5- Résultats de l'étude statistique:

### 5-1- Répartition d'hémoculture selon l'age et le sexe:

En utilisant les archives de l'hôpital Ibn Zohr (Guelma) nous avons réalisé une petite analyse statistique sur les dossiers enregistrés depuis janvier 2010.

**Tabl0 : répartition d'hémoculture selon le sexe et l'âge**

patients années	Homme	Femme	Enfant (0-12)	Adulte (+12)
2010	97	57	0	18
2011	17	16	3	4



**Fig 10. Répartition d'hémoculture selon l'âge et le sexe**

## 5-2- Répartition mensuelle d'hémoculture:

Tab11: Répartition mensuelle d'hémoculture

années / mois	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Jeu	Jui	Aoû	Sep	Oct	Nov	Déc	Totale (CP)
2010	0/7	0/4	3/27	1/14	0/15	0/16	0/22	0/34	0/30	1/13	0/11	2/19	7
2011	2/23	0/12	5/10	0/6	1/7								8

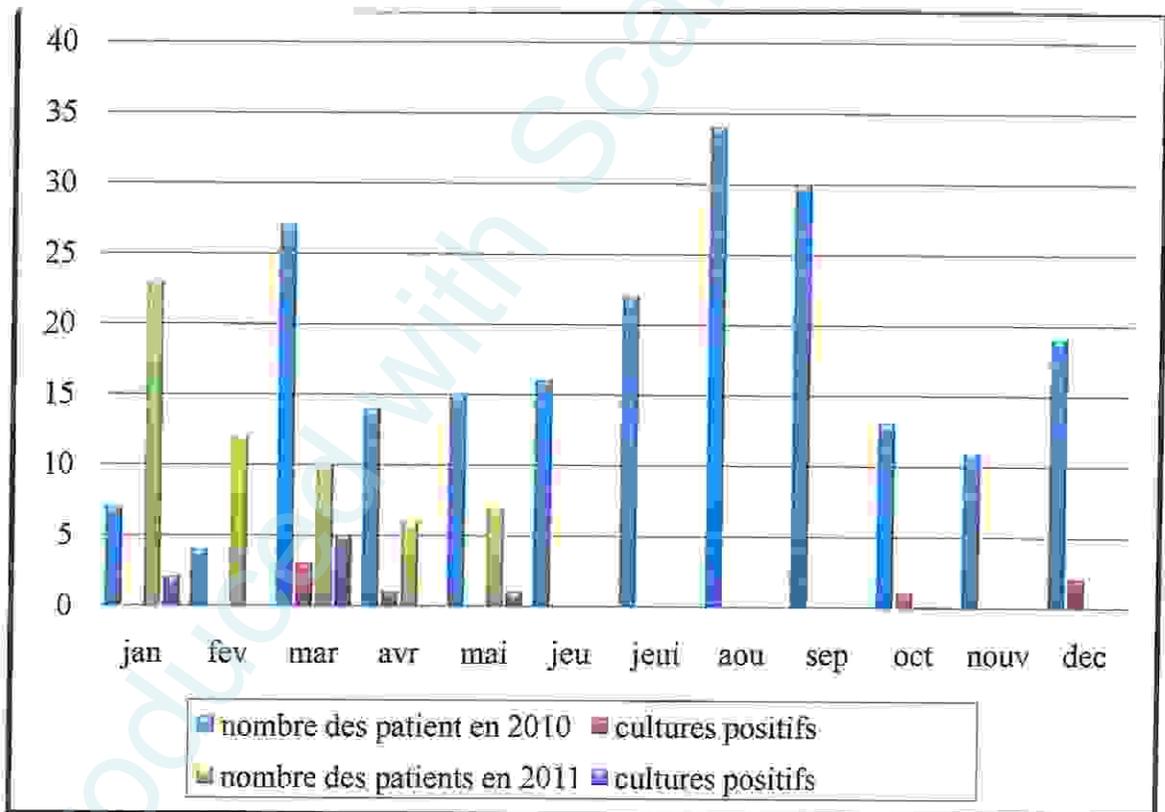


Fig11: Répartition mensuelle d'hémoculture

## II-Discution et interprétation des résultats:

Au cours de notre étude on a analysé 9 prélèvements de sang hémoculture afin d'isoler et identifier les espèces bactériennes qui infectent le sang au cours des septicémies dont ces échantillons sont prélevés de 9 patients de différents âges et de différents sexe (19ans H, 80ans F, 4 ans H, 9 mois H, 11 mois H, 18 ans, 39 ans F, 75ans H, et 3 ans F) . Chaque prélèvement est constitué de 03 flacons bprélevés au cours des pics de température espacé de 15 à 20 min.

Après l'incubation, les flacons qui présentent des signes de culture (hémolyse, culot) ont été tous repiqués sur 03 types de milieux de culture solides :

- GN: milieu ordinaire
- GSC: milieu enrichis
- Chapman, Hectoen et Mac Conckey: milieux selectifs

Après ensemencement et incubation de ces milieux, seuls les échantillons 1, 2, 4, 5 et 8 ont donnés des cultures positives. Les échantillons 1, 4 et 5, ont poussés sur les milieux : GN, GSC, et Chapman (l'aspects macroscopique des colonies et l'aspects microscopique des cellules sont résumés dans le tableau 6 et figs 7 a et 7 b) et on a pu identifier les espèces isolé grâce a des tests enzymatiques (démontré dans le tableau 8). Ces souches sont : *S.saprophyticus*, *S.epidermidis*. les échantillons 2 et 8 ont poussés sur GN, GSC, Hectoen et Mac Conckey (aspects macroscopique des colonies et l'aspects microscopique des cellules est résumé dans le tableau 6 et Fig 7 c. et d) et pour identifier les espèces isolées on a utilisé la Galerie API 20E puisqu'il s'agit Entérobactéries: les souches sont *E. cloacae* et *E. coli*.

En règle générale, l'isolement répété de la même souche bactérienne pathogène opportunistes ou saprophytes dans plusieurs hémocultures (au moins 02) pour le même prélèvement on peut poser le diagnostique d'une infection bactérienne véritable et c'est le cas dans les prélèvements 1, 2 et 5 car on a isolé des espèces bactériennes opportunistes qui sont : *S.saprophyticus*, *S.epidermidis* et *E. cloacae*.

Cependant, l'isolement d'une souche bactérienne pathogène opportuniste ou saprophyte à partir d'un seul flacon d'hémoculture comme c'est le cas des prélèvements 4 et 8 l'incrimination du germe est soumise à des conditions:

- On vérifie le service d'où provient le prélèvement d'hémoculture s'il est effectué dans le service d'oncologie ou de Réanimation :
  - On doit définir la porte d'entrée du germe;
  - On réalise d'autres hémocultures;
  - L'état immunologique du patient et son âge.
- S'il provient d'autre service on peut estimer que c'est une contamination probable.

La culture négative des prélèvements 3, 6, 7 et 9 sur les 03 types de milieux de culture utilisés peut être due en premier lieu :

- A la quantité du sang inoculé (2-5ml) dans les flacons puisque on a utilisé des petits flacons de 125 ml (flacons de pédiatrie);
- A la période d'incubation qui peut être insuffisante;
- Au milieu de culture (bouillon d'hémoculture) inapproprié.

Les résultats obtenus de l'antibiogramme montrent que les souches isolées manifestent une résistance ou une sensibilité vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés:

- *S. saprophyticus* est sensible à la tércaryline (TEC) (zone d'inhibition est de 36 mm > 10 mm) et résiste à la oxacyline (la zone d'inhibition est de 08 mm < 10mm).
- *E. cloacae* est sensible à la CIP (zone d'inhibition 31 mm > 10 mm) et résiste à l'amoxyline (AMX) ( zone d'inhibition est de 6mm < 10mm) .
- *S. epidermidis* se résiste à la céphalosporine et fosphomycine (zone d'inhibition est de 6mm < 10mm) et sensible vis-à-vis le préstamycine zone d'inhibition est de 38mm > 10mm).
- *Escherichia coli* est résistante vis-à-vis l'amoxyline( zone d'inhibition est de 6mm < 10mm) et sensible au TPN (zone d'inhibition est de 36mm > 10mm).

Les résultats de l'étude statistique nous montrent que les taux d'hémocultures positifs sont plus grands chez les hommes que chez les femmes ce facteur est lié au lieu de travail.

Ce taux est aussi élevé au mois de mars par rapport aux autres mois au cours des années 2010 et 2011 du fait des grandes variabilités climatiques. Ce mois marque aussi le début des cycles reproductifs chez les plantes (grains de pollen) qui est souvent la cause de la transmission des maladies principalement respiratoires (pneumonie).

### Conclusion:

Au cours de ce travail, on a isolé les bactéries à partir des flacons positifs d'hémocultures pour les identifier et les caractérisés afin de poser le diagnostic rigoureux des maladies infectieuses.

On a travaillé sur 9 échantillons dont 5 seulement ont été positifs et à travers lesquels on a pu isoler et identifier des espèces bactériennes pathogènes telle que: *Staphylococcus saprophyticus* à partir de 2 échantillons, *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli*; dont dans les cas des de *S. saprophyticus* et *Enterobacter cloacae* on a posé directement le diagnostic des maladies infectieuses par contre dans le cas des *S. epidermidis* et *Escherichia coli* on n'a pas pu estimer que les germes isolés sont responsable de maladies infectieuses sans savoir la porte d'entrée du germe et l'origine de prélèvement.

Nous concluons que l'hémoculture est un examen performant dans le diagnostic des maladies infectieuses. Il est de pratique courante dans les structures hospitalières. La fréquence de sa pratique ne cesse d'augmenter vue la présence de plus en plus de personnes fragiles (âgés, diabétiques, immunodéprimés, cancéreux...) infectés et la virulence de certains germes ayant acquis une sensibilité diminuée voire une résistance à certains antibiotiques.

Cependant le seul risque qui peut fausser les résultats de cet examen est la contamination des prélèvements par des germes que ce soit lors du prélèvement ou lors du transport qui touche de 10 à 15 % des hémocultures réalisées, ce qui constitue un problème de gaspillage de matériels et une perte de temps pour le malade, du fait que ce type d'examen exige un respect strict des règles de prélèvement et de transport vers le laboratoire.

# **Références Bibliographiques**

Produced with ScantOPDF

### Bibliographie

- C Nauciel, J L Vildé, bactériologie médicale, Masson, Paris, 2005,257P
- F. Fuerst, 1976, microbiologie clinique, Montréal, les éditions HRWL ,407 p
- J L Fauchère, bactériofiches, ellipses, Paris 1997, 175P
- Jérôme J. Perry, James T. Staley Stephen lorry, 2004, microbiologie, paris, Dunod, 891p.
- Lansing M. Prescott, John P. Harley et Donald A. Klein, 2003, microbiologie, Bruxelles, de Boeck. 1137p.
- N marchal, J L Bourdon, C P Richard, les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries,Doin, Paris, 1982, 483P
- N Gontcharoff,clé d'identification des bactéries hétérotrophes ,Dunod,paris,1971, 97P
- F Denis,M C Ploy,C Martin,E Bigen,bactériologie médicale –techniques usuelles, masson,Paris,2007,573P
- C.Dellaras, Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire, le voisier, Paris, 2007, 476P.
- C.Pilet,J.L.Bourdon,B.Toma,N.Marchal, C.Balbastre, J.M. Person, Bactériologie médical et vétérinaire, Doin, Paris 1987, 372 P.

Produced with Scantopdf

### Webographie

- [site ] <sup>2</sup><http://bacerioweb.univ.fconte.f/bibliotheque/remic/17-hemocu-pdf>, hémoculture, consulté le 14 mars 2011.
- <http://dictionary.reference.com/browse/hemocultures>, consulté le 24 mars 2011
- Houidi, Qualité du prélèvement des hémoculture,<http://memorias.ioc.fiocuz.br/94sup1/430ft.html> consulté le 1Avril 2011
- Medcin.com, hémoculture, <http://www.definition-of.com/hemoculture> consulté le 5Avril 2011.
- Benabdellaziz Nadia,protocol hémoculture,<http://www.cdc.gov/ieip/pdf/sop.pdf>, consulté le 5Avril 2011.
- S. Y. ANAGONOU1, S. AKPONA2, R. JOSSE3, A. MASSOUGBODJI1, B. C. SADELER1, les isolements de bactéries dans les hémocultures au laboratoire de la bactériologie du CNHU-Contonou (1987-1990),
- <http://www.santetropicale.com/resume/1,4010.pdf> Consulté le 7Mai 2011.
- World lingo, la culture du sang,[www.infirmiers.com/.../fiche-technique-hemocultures.html](http://www.infirmiers.com/.../fiche-technique-hemocultures.html) consulté le 7 Mai 2011

Produced with Scantopdf

# Annexes

Produced with ScanTOPDF

## Les différents types de milieux de culture:

- **Définition:**

Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, spécifiquement fabriqué pour la croissance, le stockage ou le transport des bactéries. Quand il sert à la croissance, le milieu fournit généralement tous les éléments nutritifs nécessaires. Avant l'emploi un milieu de culture doit être stérile, c'est-à-dire qu'il ne doit pas contenir d'organismes vivants (microorganismes).

- **Les types de milieux de cultures:**

- **Les milieux ordinaires:**

Ces milieux conviennent à la culture des bactéries peu exigeantes, dont ils maintiennent l'aspect morphologique classique, macroscopique et microscopique. Ils peuvent aller de base aux milieux enrichis parmi lesquels on trouve gélose nutritive.

- **Les milieux enrichis de produits biologiques:**

Boillons ou gélose peuvent être enrichis par l'addition de substances organiques ou biologiques telles le sang, le sérum, de liquide d'ascite ou d'extrait globulaires.

Ces substances organiques peuvent être indispensables à la vie de certaines bactéries :

- Soit en neutralisant certains inhibiteurs présents dans la gélose ou à la surface de la verrerie
- Soit en leur apportant certains facteurs de la croissance

Parmi lesquels on trouve la GSC (gélose nutritive + quelques ml de sang stérile)

- **Les milieux sélectifs:**

Un milieu sélectif est un milieu qui favorise la croissance de certaines bactéries au détriment des autres. Dans une certaine mesure, tous les milieux sont sélectifs; dont il n'existe aucun qui assure une croissance identique de tous types de bactéries.

Tab : la composition des différents types de milieu de cultures utilisés

Milieu	Compositions	
	Composant	Quantité (g/l)
Gélose nutritif	Macération de viande	1
	Peptone typique	15
	NaCl ou KCl	5
	Agar	15 à 20
	pH= 7,6 à 7,8	
Culombia	Peptone (AA+vitamine)	23
	Amidon	1
	NaCl	5
Muller Hinton	Infusion de viande de bœuf	300
	Hydrolysate de caséine	
	Amidon	17,5
	Gélose	1,5
	pH= 7,4	17
Chapman	Peptone	1
	Extrait de viande	1
	Chlorure de sodium	7,5
	Mannitol	10
	Agar	15
	Rouge de phénol	0,025
Hectoene	Protéose peptone	12
	Extrait de levure	3
	Chlorure de sodium	5
	Thiosulfate de sodium	5
	Sels biliaires	9
	Citrate de fer ammoniacal	1,5
	Salicine	2
	Lactose	12
	Saccharose	12
	Fuchsine acide	0,1
	Bleu de bromotimole	0,065
	Agar	15
	PH=7,5	
	Mac Conckey	Peptone de caséine
Peptone de viande		13
Lactose		10
Mélange de sels biliaires		1,5
Chlorure de sodium		5
Rouge neutre		0,03
Agar		13,5
pH=7,1		
La gélose à ADN (DNase)	Peptone pepsique (trypsique de caseine)	20
	Acid désoxyribonucleique (ADN)	2
	NaCl	5
	Agar	15
	pH= 7,3	

**Résumé:**

Au cours de notre étude pratique réalisé au niveau du laboratoire de l'hôpital Ibn Zohr nous avons isolé quatre espèces bactériennes (*Staphylococcus saprophyticus*, *S.epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) a partir de neuf échantillon examinés. Ces bactéries ne sont pas vraiment pathogènes mais leur présence dans le sang est anormale.

L'étude statistique réalisée a partir du registre de l'hôpital étalée sur une année et demie a montré que la maladie touche beaucoup plus les adultes que les enfants et les hommes que les femmes.

**Mots clés:** Hémoculture, isolement des bactéries, antibiogramme, prélèvement sanguin.

**Abstract:**

During our practical study conducted in the laboratory of the hospital Ibn Zohr, we isolated four bacterial species (*Staphylococcus saprophyticus*, *S.epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) from nine examined samples. These bacteria are not really pathogenic but their presence in the blood is abnormal.

The statistical study from the registry of the hospital spread over a year and half has shown that the disease affects far more adults than children and more men than women.

**Keys words:** blood culture, bacterial isolation, antibiogram, blood sampling.

**ملخص:**

خلال دراستنا العملية التي أجريت في مستشفى "ابن زهر" عزلنا أربعة أنواع بكتيريا (*Staphylococcus saprophyticus*, *S.epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) من فحص تسع عينات، هذه البكتيريا ليست ممرضة لكن وجودها في الدم غير طبيعي.

و قد أظهرت الدراسة الإحصائية من تسجيلات المستشفى التي تمت خلال سنة و نصف أن المرض يصيب البالغين أكثر بكثير من الأطفال و الرجال أكثر من النساء.

**كلمات البحث:** زرع الدم، عزل البكتيريا، عينات الدم، دراسة المضادات الحيوية.