الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE 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)**	**Université de Guelma**
Examinateur	**: M. ATOUSSI Sadek (M.A)**	**Université de Guelma**
Encadreur	**: M. HOUHAMDI Moussa (Pr)**	**Université de Guelma**

Juin 2011

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Remerciements

Au terme de ce travail

Nous remercions notre Dieu de nous avoir accorde 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'examinateur 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'hopital Ibn Zohr de Guelma, en particulier **Mme Saidia . F .***

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

Produced with ScanTOPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

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 neuveu 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

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 mére.

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

Gherab Wided

Produced with scantopdf
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 mére.
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.

Khadidja

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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

Produced with ScanToPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

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
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 *Enterobacter cloacae* et de *E.col.*	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 ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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'abtibiogramme de la souche *S.epidermidis*.	31
Figure10 : Répartition d'hémoculture selon l'âge et le sexe.	34
Figure11 : Répartition mensuelle d'hémoculture.	35

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Liste des abréviations

ADN : Acide desoxyribonucleique

AMX : Amoxyline

ATB : Antibiotiques.

C : Céphalosporine

CIP: Ciprofloxacine

CM :Gentamycine

CMI : Concentration minimale d'inhibition.

CRO : Ceftrixaxone

CTX: Céfotaxine

CZ : Céfazoline

DO :Doxémycine

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 :Péstimamycine

SPS : Polyanétol-Sulfonate de Sodium

TEC :Técarcyline

TM : Tobramycine

Produced with ScanTOPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

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.

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Chapitre I: Partie théorique

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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][1]

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 disparait puis revient avec le même germe. Elle est classiquement associe à une infection cloisonnée non ou mal drainée, tel un abcès intra-abdominal, ou un empyème sous dural, mais se voie aussi dans les infections tissulaire focalisées. ..... [Site][1]

1-3-Bactériémie continue:

Elle est observé 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][1]

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.

Produced with scantopdf
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Donc, la bactériémie peut s'étende 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 trombophlébitique:**

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 liber de grande quantité d'endotoxines qui passe dans le sang, il s'ensuit des chocs endotoxiniques fréquents et une fièvre rythmé ou en plateau de plus en plus élevée. Les bactéries impliquées sont dites intracellulaires notamment les Salmonelles (*Salmonella typhi)* et Brucelles (Brucellose). (Faucher 1997).

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

⇒ **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 élevé mais reste permanente. les bactéries responsables sont les Streptocoques. Les germes constituent au sein de la végétation des micro-colonies peut 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 *Staphyloccocus aureus* et non doré qui ont colonisées le matériel étranger. (Faucher 1997).

Produced with ScanTopPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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'interval, effectués si possible au moment d'un pic d'hyperthermie ou d'hypothermie ou lors de frissons qui signent une décharge bactériémiques.

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.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

⇒ 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.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

On peut distinguer entre autres, les Staphylocoques (espèce *aureus* ou à coagulase négative), les Enterocoques 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 baumanii* et *Stenotrophomonas maltophilia.* …… [Site]

Produced with ScanToPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

Chapitre II: Matériel et méthode

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 utilisé 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 est ensemencé dans des flacons spéciaux, deux types de flacons sont ensemencés, un flacon aérobie et un flacon anaérobie, permettant ainsi de détecter les germes aérobies et anaérobies.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

→ **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 réniforme 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 épicrânienne.
- 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.

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 a 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 Biphasique (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 SCHAEDLER 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 C02.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 CO2 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.

Produced with scantopdf
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

- 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)

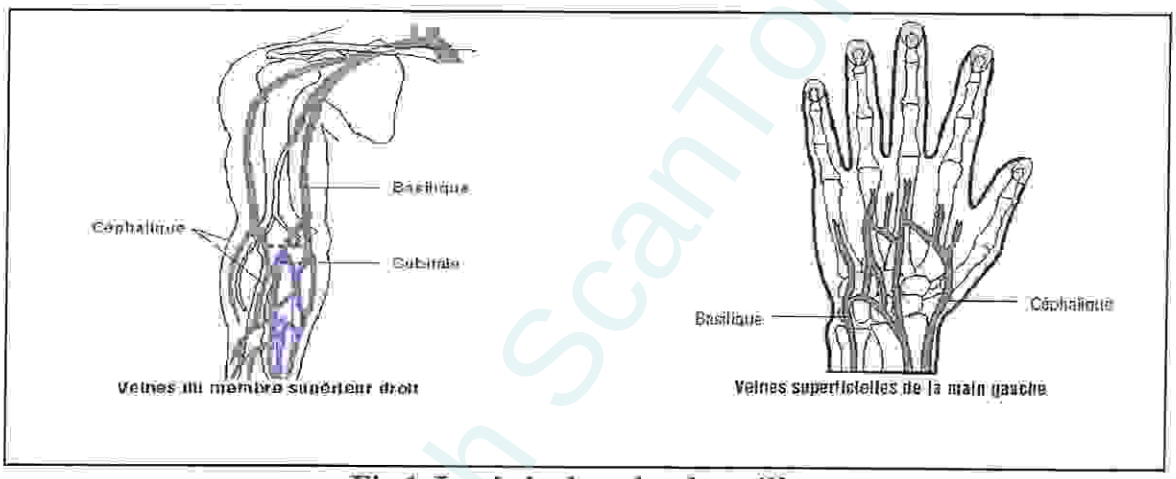


Fig 1. Le choix du point de prélèvement

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)

Produced with ScanTopPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 6ème 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)

Tab1 : Différents aspects du bouillon d'hémoculture en cas de positivité

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

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

⇒ **Détection automatisée des hémocultures positives:**

Des automates permettent aujourd'hui de détecter les hémocultures positives grâce à la mise en évidence de produits métaboliques générer lors de la croissance bactérienne (CO_2, ions H^+, variations du potentiel redox du milieu). (site)

- **Agros Sanofi-Pasteur:**

Cet appareil mesure la production du CO_2 à travers le verre par spectrophotométrie. Le dosage du CO_2 se fait après transfert du flacon vers un plateau de lecture, la mesure est prise pendant trois seconde 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 " CO_2 Sonsor" de couleur verte. Le sonsor est séparé du boillon par une membrane semi-perméable qui ne laisse passer que le CO_2. La production du CO_2 entraine une diminution du pH est le sonsor devient jaune. Le virage du couleur est interprété par réflectométrie, chaque lecture compare la variation du couleur à la précédente, chaque flacon dispos de sa propre cellule de lecture. (site)

- **Bactec Becton Dickinson:**

Le principe est également basé sur la l'existence d'un sonsor sensible à la variation du pH, cette décroissance est mesuré par une coloration fluorescente elle-même est mesuré 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 CO_2, la croissance est aussi détecté par variation du pH et modification du potentiel redox du milieu.

Produced with scanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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.(Fauchère1997)

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.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 sont ensemencés parallèlement sur des milieux de culture .On les effectue à la moindre suspicion de culture, de façon systématique à 18-24 h, 5-6ème 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_2 pendant 48 h et examinées à la 24ème heure puis à la 48ème heure.

Pour les échantillons 1, 4 et 5 on a observé le même aspect macroscopique des flacons ; donc on a ensemencé 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 a ensemencé 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 a ensemencé les milieux de cultures suivants; la GN comme milieu ordinaire, la GSC comme milieu enrichit.

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

⇒ L'ensemencement par quadrant se réalise on suivant les étapes suivantes:

- L'inoculum est déposé prés de bords de la boite de Petrie.
- Par une pipette Pasteur on fait étaler le dépôt par des stries très séries jusqu'on atteindre le diamètre horizontale de la boite, on a donc recouvert les quadrants 1 et 2.
- Flamber la pipette Pasteur et fait tourner la boite de 90°et on réalise la meme opération
- La semence précédemment déposée sur le quadrant 2 est étalée sur le quadrant 3.
- On fait tourner la boite de 90° et la semence du quadrant 3 est épuisée sur le quadrant 4.
- Aprés culture on obtient en 4 des colonies isolé, facile à prélever.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Tab2: Hémocultures spécifiques

Agents recherchés	Milieux de culture adéquate	T° et duré d'incubation
Brucella sp	Columbia au sang frais Columbia au sang cuit	37°C 48h-72h sous 5%CO_2
Compylobacter sp	Columbia au sang frai Columbia au sang cuit	37°C 3-4 jours sous 5%CO_2 Microaérophilie
Legionella sp	BCYE	37°C 15jrs 5%CO_2
HACEK	Colombia au sang frai Colombia au sang cuit +PVX	37°C 4jrs sous 5%CO_2
Abiotrophia sp *Granulicatella sp*	Columbia + sang frais+strie de Staph (Satellitisme) Autres : Columbia +sang frais+ 0,001% Pyridoxal Enrichissement sur TODD HEWITT + PVX	37°C 3jrs S/CO2
Bartonella quintana où *Bartonella henselae*	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% CO2 37°C 10 jrs /C02
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 Ureaplasma	Culture en bouillon PPLO (Pleuropneumoniae like organisms) ou en gélose A3	37°C Microaérophilie 3 jours

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 prélevé a partir de la culture et on homogénéise le tous et on le recouvre par une lamelle de façon longétidunale afin d'éviter la formation de bulle d'aire puis observer au microscope a l'objectif (x40) pour avoir si la mobilité de la bactérie a étudier. (Singleton 2004)

2-5-1-2-la coloration de Gram:

- **Preparation des frottis:**

Après avoir stériliser la lame, on prélève une ou plusieurs gouttes de la suspension bactérienne et on la mettre sur la lame puis en 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 traitant avec l'éthanol (95%) pendant 1 à 3 seconde seulement;

→ Rincer a nouveau à l'eau courante;

→ On soumet ensuite le frottis a une contre coloration de 30 seconde a la fuchsine basique diluer;

→ Après Rinçage à l'eau courante, on sèche le frottis au buvard,

→ En fin on met une goutte d'huile cèdre et on examine a l'objectif a immersion (grossissement x1000). (Singleton 2004)

Produced with ScanTopPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 aérobiose et anaérobiose, *staphylococcus saprophyticus* actif en aérobiose et *staphylococcus epidermidis*, qui observé par un virage de couleur vers le jaune sur milieu Chapman (pili et al, 1987).

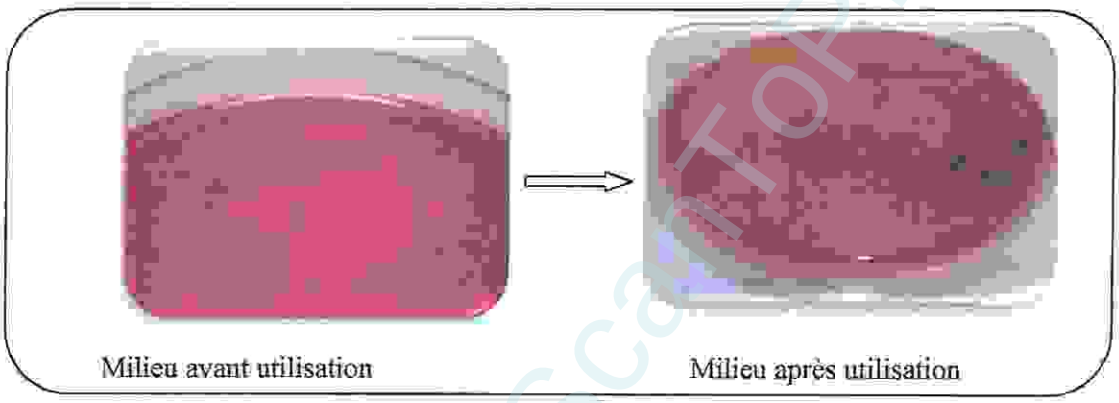


Fig 2: la fermentation du mannitol

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 claire 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)

Produced with scanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 :

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

- **La méthode:**

Déposer dans une lame propre, une goutte d'eau oxygénée (H_2O_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, ensuit incuber 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 aprés 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 boite de pétri stérile contienne le milieu de culture DNase, on fait l'ensemencement de trois souches différents, la souche à tester, *E.coli* comme temoin négatif, et *Staphyloccocus aureus* comme témoin positif, puis l'incubation à 37°C pendant 24h.

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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

Lecture

Quant on va voir une résistance de la souche à tester comme la souche *Staphyloccocus 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_2S 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)

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

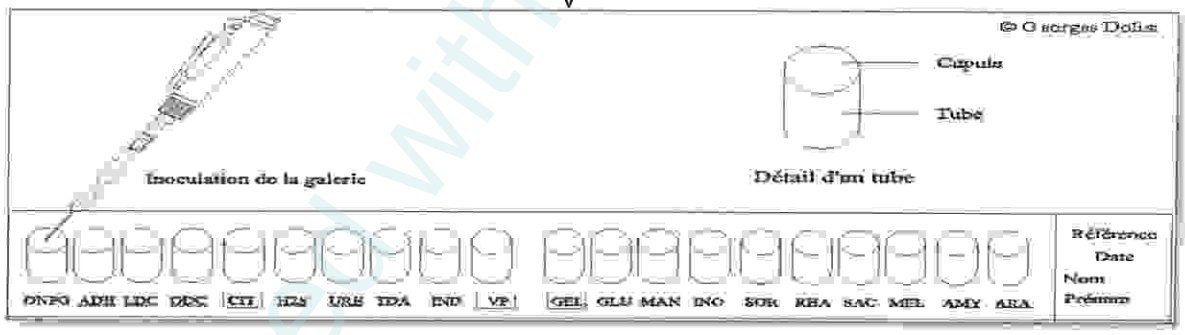
Tab3:Extrait du tableau de lecture de la galerie API20E (Delarras 2007)

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 (orthinine décarboxylase)		
CIT	Trisodium citrate (utilisation)	Vert-pal/jaune	Bleu-vert/bleu (dans la cupule)
H_2S	Sodium thiosulfate (production d'H_2S)	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée(Uréase)	jaune	Rouge/Orangé
TDA	L-triptophane (triptophane désaminase)	jaune	Marron-rougeatre
IND	L-triptophane (production d'indole)	Incolore Vert-pal/jaune	Rose
VP	Sodium pyruvate (production d'acétoine	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		

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Présentation de la galerie

Préparation de l'inoculum de



L'ensemencement de la galerie

Résultat de l'ensemencement

Incuber a 37°C/24h

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

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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.

→ On ensemence 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).

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

- **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)

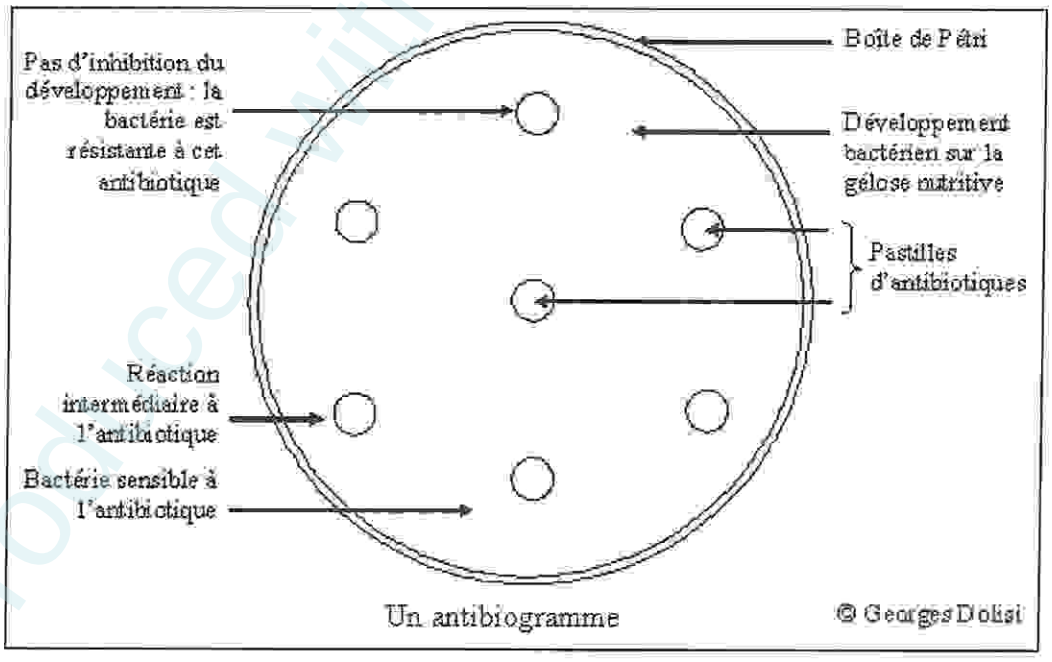


Fig 4: présentation schématique d'un antibiogramme

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Chapitre III: résultat et discussion

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 étudies après une durée significatif d'incubation (période d'incubation durant laquelle apparaissent les premières signes de positivité des flacons) qui dure de 48h a 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

Produced with ScanTopPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

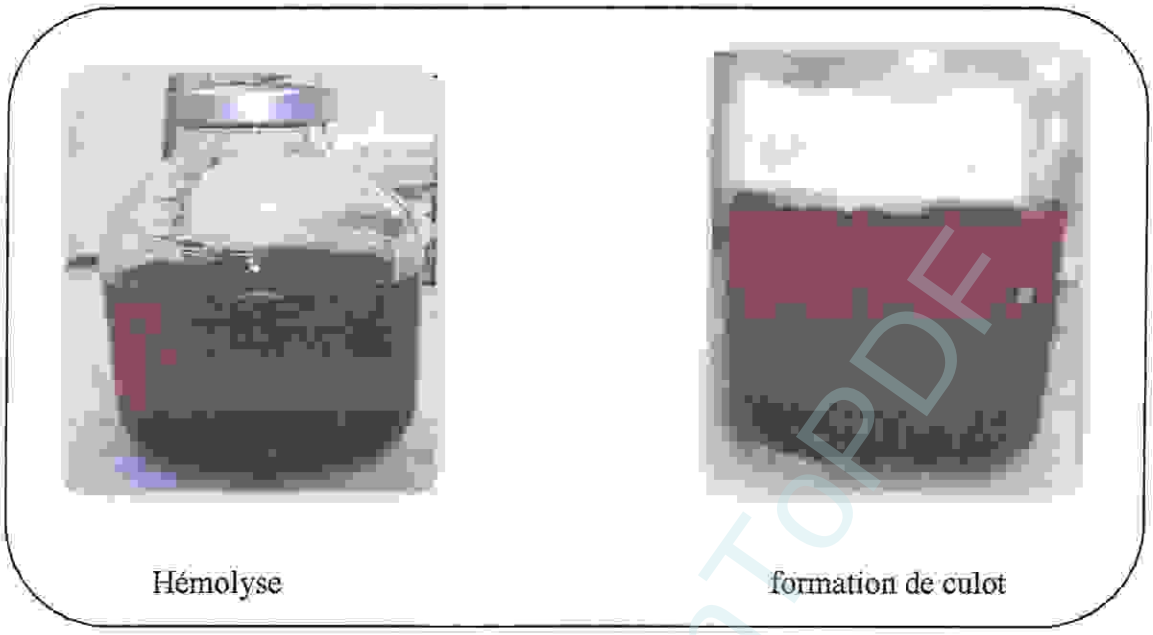


Fig 5: les différents aspects macroscopiques des flacons d'hémocultures

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

Produced with Scan TO PDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

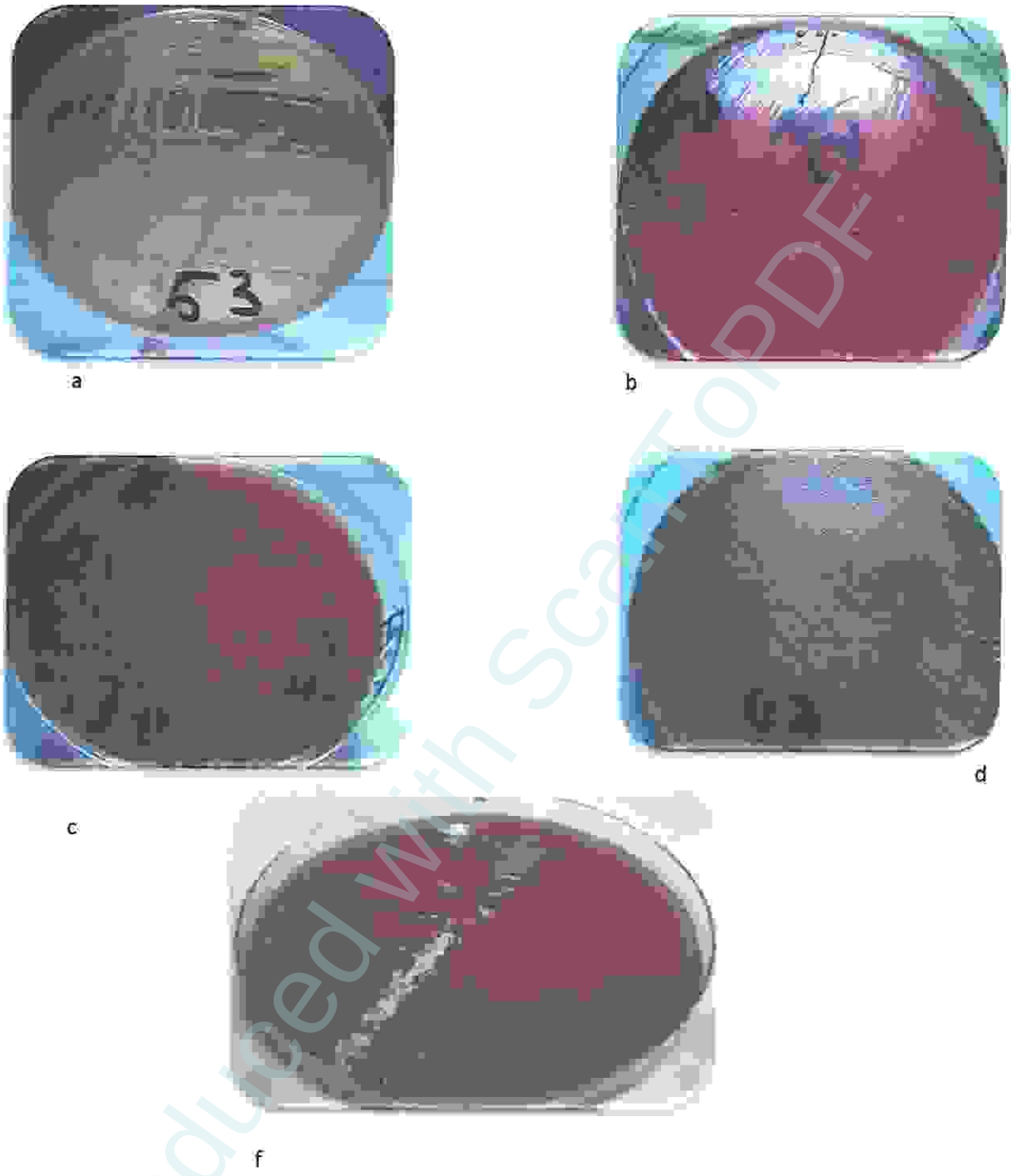


fig 6 : aspect macroscopique des colonies

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.

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

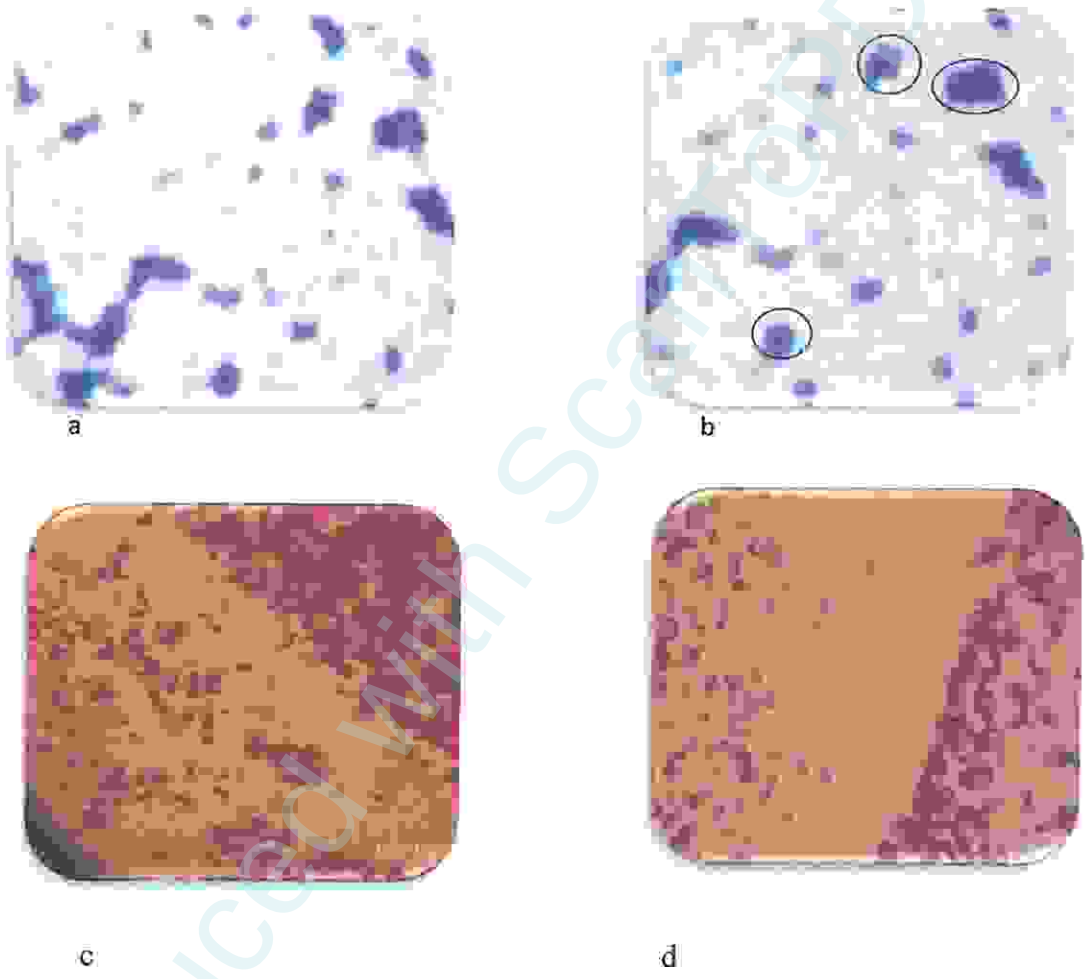


Fig 7: vue microscopique du résultat de Gram

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

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

Produced with ScantoPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 *Entérobacter cloacae* et de *E. coli* . Les tableaux suivant résument les résultats de ces tests.

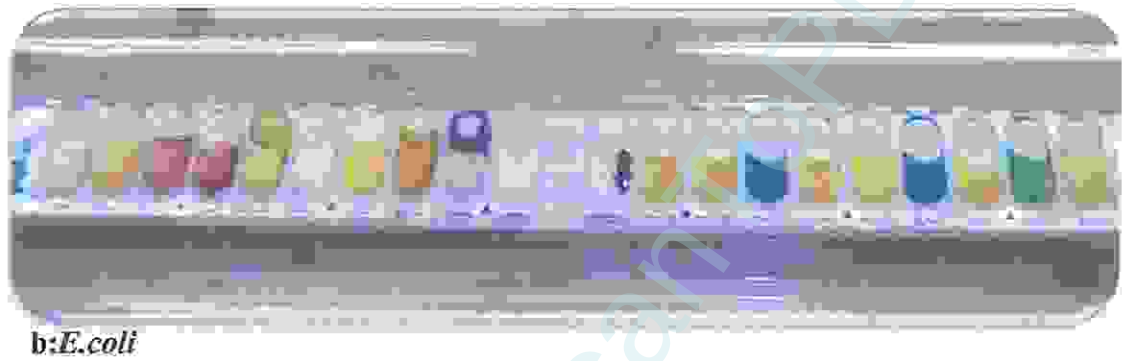
3-1-Résultat de la galerie API 20E :

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_2S	-	-
URE	-	-
TDA	-	-
IND	-	+
VP	+	-
GEL	-	-
GLU	+	+
MAN	+	+
INO	-	-
SOR	+	+
RHA	+	+
SAC	+	-
MEL	+	+
AMY	+	-
ARA	+	+

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

a : *E.cloacae*



b:*E.coli*

fig 8: Résultats de la galerie API 20^{E}

3-2- Résultats des tests biochimiques:

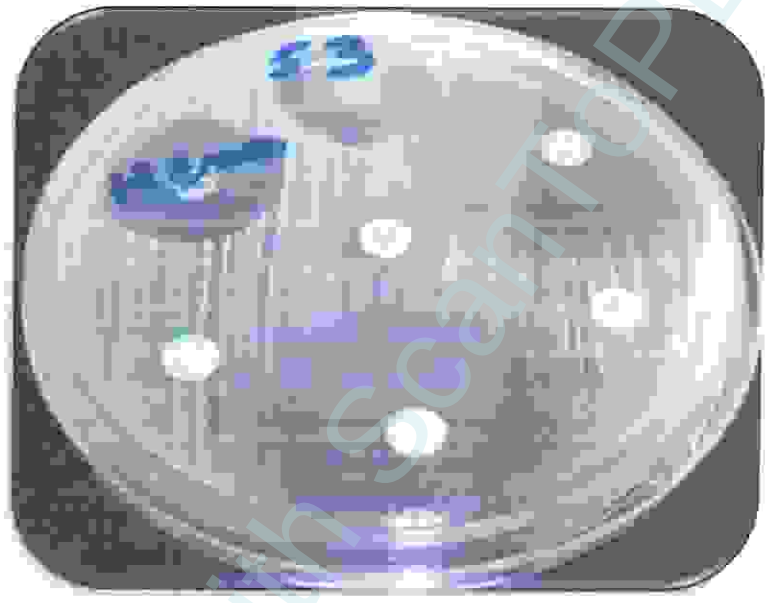
Tab 8:Résultats des tests biochimiques

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

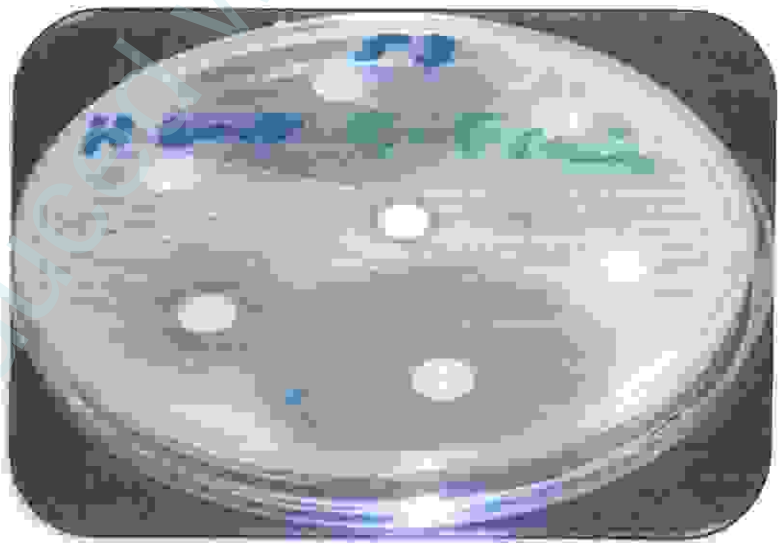
Produced with Scanto PDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

4- Résultat de l'antibiogramme:

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



P1



P2

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

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Tab 9: Résultats de l'antibiogramme

Echantillon	Antibiotiques	Zone	Résultat	Souche
1	C	28	Sensible	*Staphylococcus*
	TE	30	Sensible	*saproohyticus*
	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	*Entérobacter*
	N	24	Sensible	*cloacae*
	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	

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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	*Echerichia coli*
	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	

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 janviers 2010.

Tab10 : 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

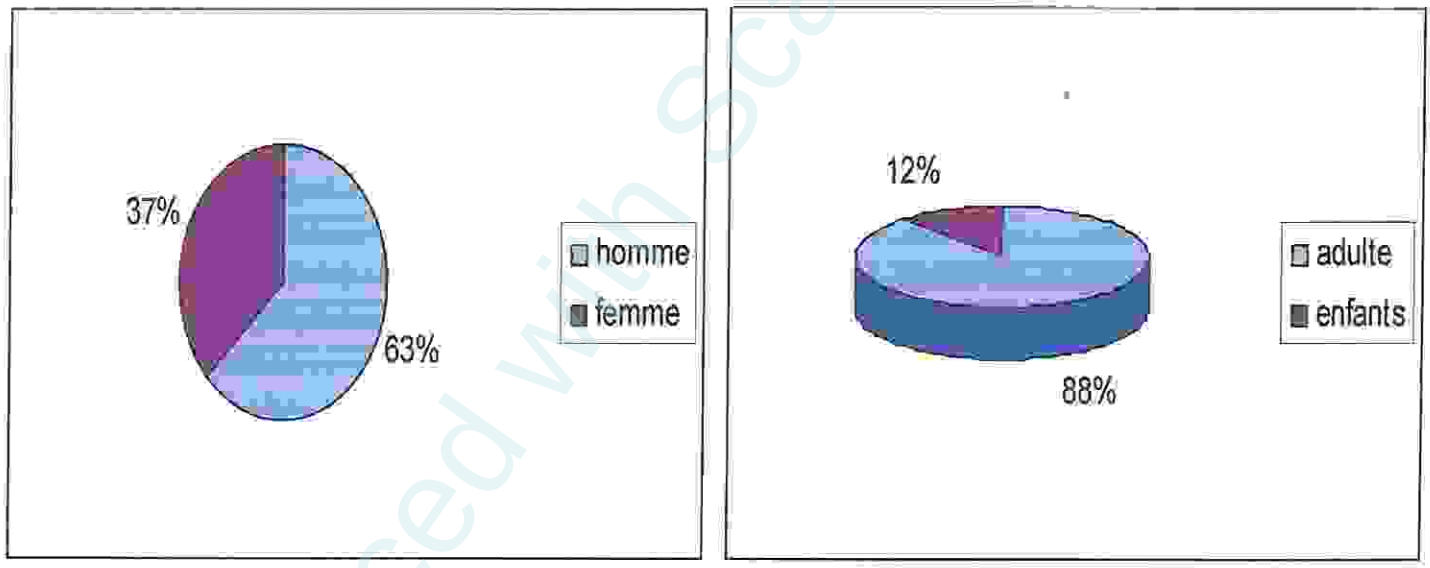


Fig 10. Répartition d'hémoculture selon l'âge et le sexe

Produced with ScanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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

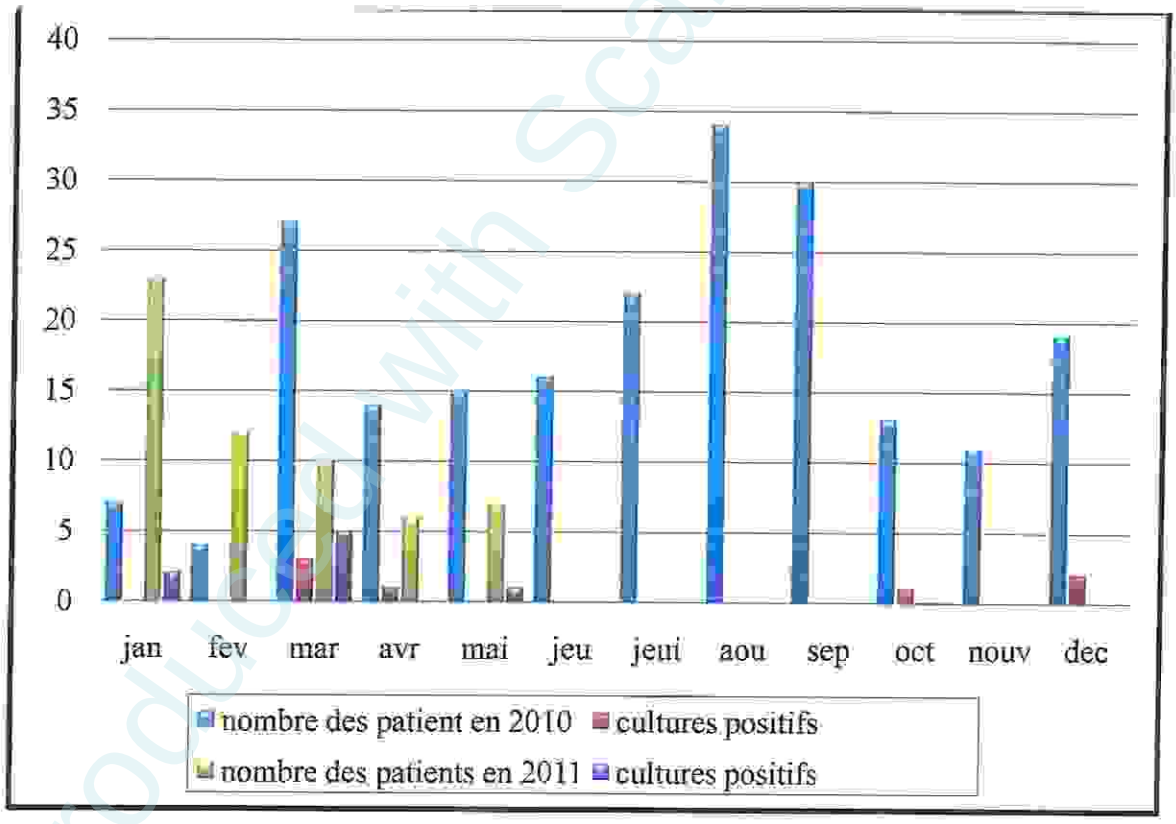


Fig11: Répartition mensuelle d'hémoculture

Produced with Scan TOPDF

www.scantopdf.eu

II-Discution et interprétation des résultas:

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,11moisH,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*.

Produced with Scan TOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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 vérifier le service d'où provient le prélèvement d'hémoculture s'il est effectuer dans le service d'oncologie ou de Réanimation :
  - On doit définir la porte d'entré 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 a la técarcyline (TEC) (zone d'ihnibition est de 36 mm > 10 mm) et résiste a la oxacyline (la zone d'inhibition est de 08 mm <10mm).
- *E. cloacae* est sensible a la CIP(zone d'inhibition 31 mm > 10 mm) et résiste a 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).

Produced with scanTOPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

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).

Produced with ScanToPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

Conclusion:

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

On a travaillé sur 9 échantillons dont 5 seulement ont été positifs et a travers lesquels on a pu isoler et identifier des espèces bactériennes pathogènes telle que: *Staphylococcus saprophyticus* a 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 diagnostique des maladies infectieuses par contre dans le cas des *S epidermidis et Escherichia coli* on n'a pas pus 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 diagnostique 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.

Produced with Scantopdf
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Références Bibliographiques

Produced with ScanTOPDF

www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

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
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

Webographie

- [site] [2]http://bacerioweb.univ.fconte.f/bibliotheque//remic/17-hemocu-pdf, hémoculture, consulté le 14 mars 2011.
- http://dictionery.refernce.com/ browse/ hémocultures, 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 bacteries 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 consulté le 7 Mai 2011

Produced with ScanToPDF
www.scantopdf.eu
www.scantopdf.eu

www.scantopdf.eu

Annexes

Produced with ScanTOPDF