

Les nombreuses études portant toutes sur les staphylocoques se justifient par la grande place qui est la leur en pathologie infectieuse humaine et vétérinaire tant par leur fréquence que par la gravité des infections dont ils sont responsables (3, 8, 23,25)

Les études taxonomiques en général, des caractères métaboliques au sein d'un même groupe en particulier, ont permis d'individualiser quelques 39 espèces et sous espèces (23) qui présentent des adaptations variables selon le biotype pouvant être l'espèce de l'hôte ou l'habitat chez un même hôte. Ainsi, certaines espèces sont spécifiques de l'homme, d'autres des animaux ; l'isolement d'une même espèce chez l'homme et chez l'animal pouvant être possible.

Outre le biotypage, l'identification d'une espèce ou sous espèce de staphylocoque peut être réalisée ou complétée par des méthodes telles que l'antibiotypie, la lysotypie, la sérotypie, le profil plasmidique, l'hybridation moléculaire de l'ADN, la zymotypie. Ces dernières techniques ne sont pas d'utilisation courante et sont donc souvent réservées à la recherche.

Plusieurs systèmes d'identification biochimique des staphylocoques sont disponibles sur le marché sénégalais et africain en général, mais le coût élevé de ces derniers limite leur utilisation dans un but diagnostique et de recherche.

Le but de ce travail est la mise au point et l'évaluation d'une méthode qui puisse concourir à l'identification des souches de staphylocoques coagulase positive ou négative isolées de produits pathologiques, de manière à rendre ce travail de routine plus rapide, plus sensible, plus fiable, et plus accessible financièrement aux populations, même les plus démunies.

# I- TAXONOMIE DES STAPHYLOCOQUES

## I-1- HISTORIQUE

Dès l'avènement de la microbiologie, la bactériologie en l'occurrence les staphylocoques ont été l'objet de nombreuses investigations menées par d'éminents microbiologistes à l'instar de **Koch, Pasteur, Ogston et Rosenbach**.

En 1878, **Koch** souligne le rôle pathogène de bactéries se présentant sous forme de cocci positivement colorés par le colorant de gram. Ces cocci seront ensuite, isolés puis identifiés d'un pus par **Louis Pasteur** en 1880 puis baptisés en 1883 par **Ogston** sous le nom de staphylocoques, du latin "staphylle" ou grappe et coccus ou "grain".

En 1884, ils sont obtenus en culture pure et classés en fonction de la pigmentation de leurs colonies par **Rosenbach** en *S. aureus* du latin "orange" et *S. albus*, du latin "blanche".

## I-2- CLASSIFICATION

Autrefois, le genre *Staphylococcus* était classé dans la famille des Micrococcaceae, notamment dans l'édition du Bergey's Manual de 1986, au même titre que les genres *Micrococcus*, *Planococcus* et *Stomatococcus*.

Cependant, les nouvelles méthodes tendent à démembrer la famille des Micrococcaceae dont l'homogénéité phylogénique est aujourd'hui contestée (4, 34).

En effet, aux méthodes traditionnelles, sont venues s'adjoindre des méthodes taxonomiques modernes basées sur l'étude de la structure de la paroi et de la membrane d'une part et d'autre part sur des méthodes génétiques.

Ces méthodes ont permis en se basant sur la composition en base de l'ADN, de mettre en évidence une parenté entre les genres *Staphylococcus* et *Planococcus* et la sous-branche *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* alors que le genre *Micrococcus* est plus proche des Actinomycètes, Corynebactéries et *Arthrobacter* (GC% respectivement inférieur et supérieur à 50%) (15, 34).

Les études d'hybridation des oligonucléotides ADN / ARN, ADN / ADN et en particulier la comparaison des oligonucléotides des ARN (6) ont démontrées que les staphylocoques forment un groupe cohérent au niveau du genre (5) et quelques nouvelles espèces décrites depuis peu, sont validées sur la base des hybridations ADN / ADN (15).

Aujourd'hui, le genre *Staphylococcus* est composé de 39 espèces et sous espèces qui se distinguent par leurs caractères phénotypiques dont l'espèce type est *S. aureus* (14, 23). Ces espèces et sous espèces constituent l'essentiel de la flore résidente de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux (6) et peuvent être classées en fonction de l'hôte.

**TABLEAU I : Répartition des Staphylocoques en fonction de l'hôte (6)**

Hôte	Homme	Homme et Animaux	Animaux
E	<i>S. schleiferi schleiferi</i>	<i>S. aureus aureus</i>	<i>S. orellettoe</i>
S	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. aureus</i>
P	<i>S. capitis</i>	<i>S. cohnii</i>	<i>S. caprae</i>
E	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. carnosum</i>
C	<i>S. hominis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. caseolyticus</i>
E		<i>S. intermedius</i>	<i>S. chromogenes</i>
S		<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. delphini</i>
		<i>S. simulans</i>	<i>S. equarum</i>
		<i>S. warneri</i>	<i>S. felis</i>
		<i>S. xylois</i>	<i>S. gallinarium</i>
			<i>S. hyicus</i>
			<i>S. kloosii</i>
			<i>S. lentus</i>
			<i>S. muscosae</i>
			<i>S. piscifermetans</i>
			<i>S. schleiferi coagulans</i>
			<i>S. sciuri</i>
			<i>S. vitulus</i>

## II - CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

### II-1- CARACTERES MORPHOLOGIQUES

A l'examen microscopique, les staphylocoques se présentent sous l'aspect de coques en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes de 3 à 5 éléments positivement colorés au Gram (14). Le mode de groupement dit en "grappe" ou en "amas" est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé (14, 34). La disposition en amas s'explique par la division cellulaire des staphylocoques en trois plans successifs et perpendiculaires les uns aux autres, et par le fait que les cellules filles ne se séparent pas complètement de la cellule mère dont elles sont issues (7).

Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant 0,7 à 1,2 $\mu$ m (14, 34), immobiles asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule (25, 14).

### II-2- CARACTERES CULTURAUX

Les staphylocoques sont en général aéro-anaérobie facultatif et poussent sur milieu ordinaire en aérobiose à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S.aureus anaerobius* (14, 25, 34) qui sont donc catalase négative.

Certaines souches nécessitent cependant une forte pression en CO<sub>2</sub> pour une croissance optimale ainsi que la présence d'autres métabolites tels que l'hémine ou la ménadione (25, 34).

Cependant, certains facteurs de croissance sont indispensables pour la multiplication des staphylocoques ; ce sont la Vitamine B1 et l'acide nicotinique.

La température optimale de croissance est de +30 à +45°C avec un maximum à 37°C et le pH varie entre 4,8 à 9,4 avec un optimum à 7,5 (14, 34).

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt (14).

En milieu solide, on observe des colonies opaques, régulièrement rondes, lisses, plus ou moins bombées avec un diamètre variant de 1,5 à 4 mm. La plupart des souches produisent alors un pigment doré ou citrin non diffusible en 24 heures à 37°C, pigment qui sera plus prononcé après 24 à 48 heures de plus à la température ambiante (14, 34).

En milieu gélosé au sang, on observe fréquemment une zone claire d'hémolyse (bêta hémolyse) autour des colonies. Ceci est lié au fait que certains staphylocoques, en particulier *S. aureus*, sont susceptibles de synthétiser quatre hémolysines distinctes et variables d'une souche à l'autre, et dont l'activité diffère selon le type d'hématie en cause (34).

La plupart des souches de staphylocoques pousse sur un milieu synthétique contenant entre autre du glucose, des sels minéraux, 14 acides aminés dont la cysteine, la vitamine B1 et l'acide nicotinique (14, 34).

A +4° C, les staphylocoques conservent leur vitalité pendant 3 mois dans le pus et pendant un an sur gélose ; ils sont détruits à 58° C au bout de 60 min d'incubation.

Il existe des colonies naines de *S. aureus* provenant de milieux contenant certains sels minéraux (chlorure de lithium ou de baryum), certains colorants (violet de gentiane, acrydine orange), certains antibiotiques (methicilline, aminosides) ou provenant de prélèvements de patients mis sous antibiotiques. Ces souches retrouvent généralement leurs caractères cultureux normaux après une ou deux subcultures (14).

### **II-3- CARACTERES BIOCHIMIQUES ET METABOLIQUES DES STAPHYLOCOQUES**

L'étude des différents caractères biochimiques et métaboliques des souches de staphylocoques a permis le développement de galeries d'identification rapides et efficaces, permettant de définir les différents profils biochimiques de souches appartenant à une même espèce (23).

#### **II-3-1- Caractères généraux**

Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *S. aureus* sous espèce anaérobios que l'on retrouve exclusivement chez les moutons (23, 27) et qui est une souche anaérobie stricte. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus* (14, 23).

#### **II-3-2- Utilisation des hydrates de carbone**

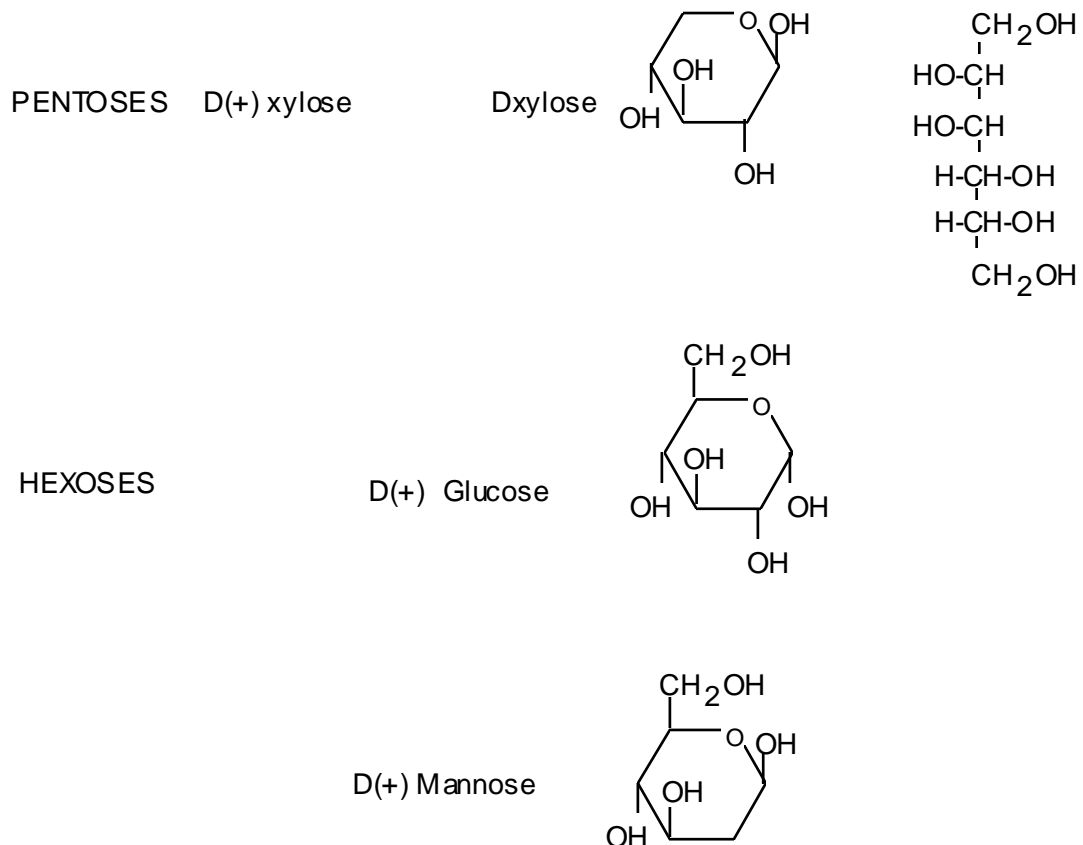
Les glucides sont utilisés de 3 manières différentes par les staphylocoques : soit après conversion par l'action d'isomérases , après hydrolyse en sucres simples ou directement, s'ils sont fournis sous une forme simple (glucose, fructose) (30).

L'assimilation étudiée surtout par la voie fermentaire mais également par la voie oxydative se traduit presque toujours par l'accumulation de dérivés acides quelle que soit la voie de dégradation. Ces acides sont responsables d'une variation de pH détectée par le virage de la coloration du milieu grâce à un indicateur coloré qui peut être le bromocrésol poupre (BCP), le rouge de phénol (RP)

## 👉 Classification

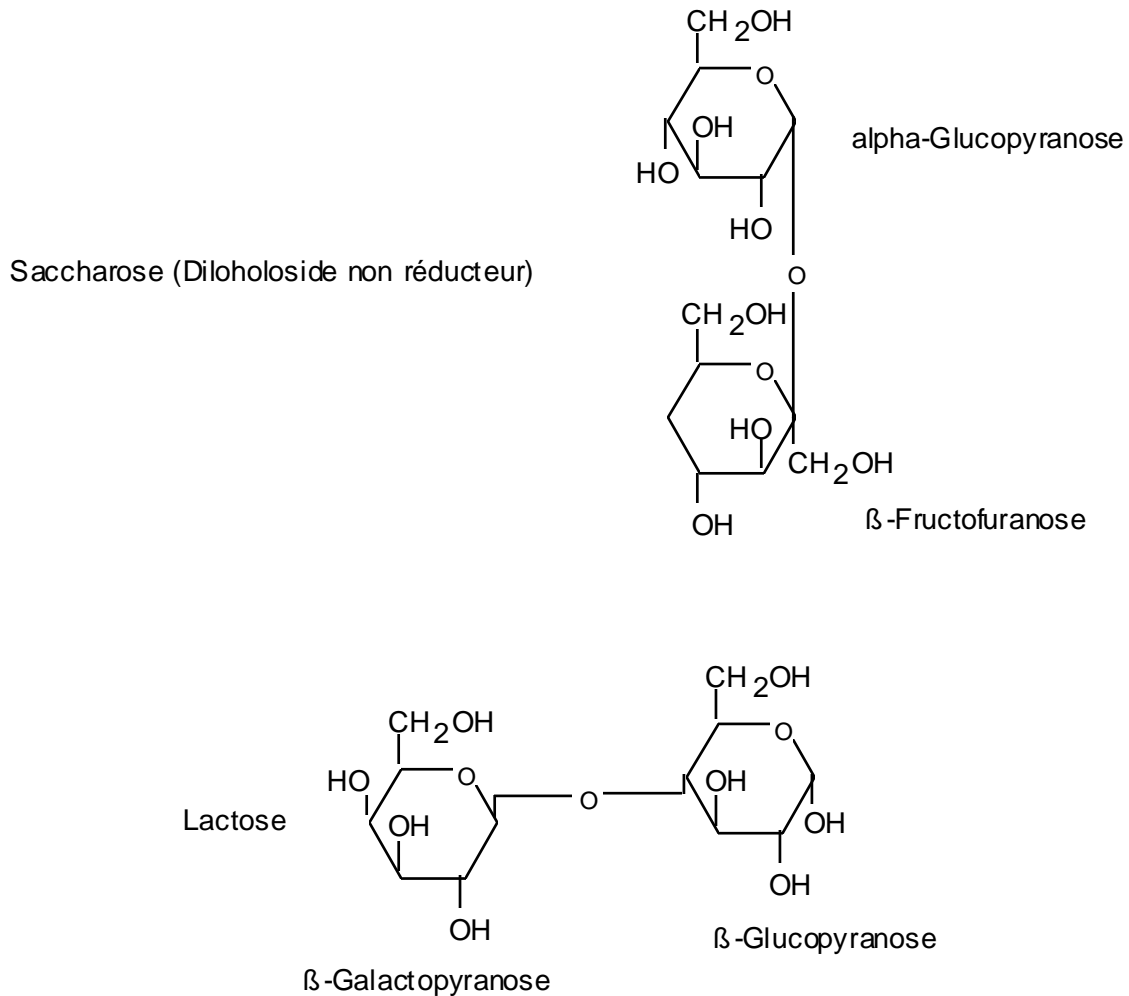
### ⇒ Les oses

Ce sont des sucres simples ayant 3 à 8 atomes de carbone avec ou sans fonction aldéhydrique ou cétonique (aldose - cétose)



## ⇒ Les Holosides

Ils résultent de la condensation de deux ou plusieurs molécules osidiques qui peuvent être obtenues à nouveau, lors de l'hydrolyse des molécules mères.



## ⇒ Les Polyalcools

Ce sont des molécules appelées de manière impropre "glucides" des polyalcools qui, par hydrolyse libèrent des sucres simples et par oxydation de leurs fonctions alcool acidifient le milieu.

Mannitol ----- Fructose

Glycérol ----- hydroxyacetone.

☞ **Voies d'utilisation. (30)**

### **II-3-2-Acidification du glycérol en présence d'Erythromycine (7)**

Ce caractère permet essentiellement le diagnostic de genre : en milieu gélosé contenant du glucose à 1% et de l'Erythromycine à raison de 0,4 mg/l, les staphylocoques, contrairement aux microcoques se développent et fermentent le glucose.

### **II-3-3-Sensibilité à la lysostaphine et au lysozyme (7)**

La lysostaphine est constituée d'un ensemble de 3 enzymes dont la principale est une endopeptidase qui coupe spécifiquement les ponts pentapeptides du peptidoglycane.

Le lysozyme est lui une enzyme qui clive les chaînes polysaccharidiques du peptidoglycane.

Les staphylocoques sont sensibles à la lysostaphine et résistent au lysozyme, contrairement aux microcoques.

La réaction se fait à l'aide de disques chargés de 100µg de lysostaphine et 50µg de lysozyme déposés sur des boîtes de Pétri pour antibiogramme (gelose MH) ou dans des tubes contenant 2 ml de tampon phosphate avec un témoin.

C'est une réaction peu stable car le résultat varie en fonction de la richesse en glycane du point interpeptidique.

### **II-3-4-Test à l'oxydase et test à la benzidine (7)**

Ils permettent de détecter les cytochromes chez les staphylocoques ou microcoques.

Le test à l'oxydase met en évidence le cytochrome C qui n'est présent que chez les microcoques à quelques exceptions près, contrairement au second test qui les met tous en évidence.

La réaction repose sur le virage du DMSO ( diméthyl sulfoxyde) au bleu en présence de cytochrome. Cependant la réaction à la benzidine se fait après extraction par défécation à l'aide de l'acide trichloro-acétique.



### **II-3-5- Test à la nitrofurantoïne (7)**

Réalisé par la méthode de diffusion en gélose à l'aide de disque chargé de 300µg de nitrofurantoïne sur la gélose Mueller-Hinton (MH), il consiste à la recherche d'une sensibilité (15 mm) des staphylocoques à ce composé.

### **II-3-6- Test à la bacitracine (7)**

Il consiste à la recherche d'une résistance des staphylocoques à l'aide d'un disque chargé à 0,02 UI de bacitracine par la méthode de diffusion en gélose (10 - 25 mm)

### **II-3-7- Test au composé vibriostatique 0/129 (7)**

C'est le 2,4 diamino 6,7 diisopropylopteridine concentré à 0,5 mg par disque.

Les staphylocoques résistent à ce composé contrairement aux microcoques.

### **II-3-8- Sensibilité à la Polymyxine B (300 unités) (7)**

Le test se fait par la méthode de diffusion en gélose Trypticase Soja Agar additionnée de sang à 5%. Après une incubation de 24 heures à 35°C, *S. epidermidis*, *S. aureus* et quelques souches de *S. hominis* sont résistantes avec un diamètre d'inhibition inférieur à 10 mm.

### **II-3-9- Activité phosphatasique (25)**

Les souches de *S. aureus*, *S. schleiferi*, *S. intermédius*, *S. hyicus* et la plupart des souches de *S. epidermidis* produisent une phosphatase alcaline détectée en utilisant un substrat chromogène tel que la phénolphtaleïne diphosphate ou le nitrophénol qui sont susceptibles de libérer les composés colorés correspondants après action de l'enzyme.

### **II-3-10- Recherche de la pyrrolidonylarylamidase (25)**

Selon le même principe qui régit la détermination d'une activité enzymatique, le substrat utilisé pour la recherche de la pyrrolidonase est le pyrrolydonyl β-naphtylamide qui sera scindé en α-pyrrolidone et β-naphtylamine qui se combine au P-diméthyl-aminocinnamaldehyde (réactif PYR de Carr-Scarborough).

Cette réaction initialement prévue pour la recherche des streptocoques du groupe A nécessite quelques modifications pour être adaptée à l'identification des staphylocoques : quelques colonies d'une culture sur gélose de 24 heures sont ensemencées dans un bouillon contenant 0,01% du réactif PYR à une turbidité équivalente à l'étalon 1 de MacFarland. Après 2 heures à 35°C, le réactif PYR ajouté au milieu sans agitation entraîne un virage du milieu au rouge-violet en 2 minutes si la réaction est positive.

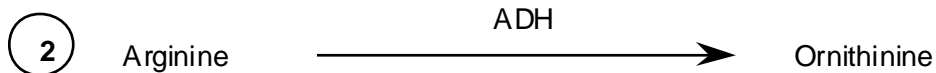
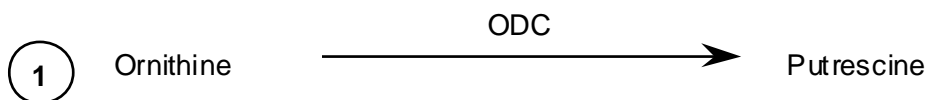
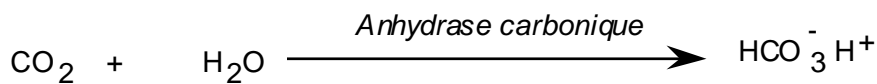
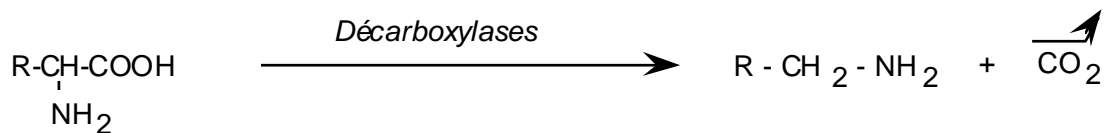
Les souches productrices de cette enzyme sont *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* et *S. intermedius*.

### II-3-11- Production de décarboxylases (25)

La production de l'ornithine décarboxylase (ODC) concerne essentiellement l'espèce *S. lugdunensis* et secondairement certaines souches de *S. epidermidis* dont l'enzyme a cependant une activité retardée.

Les décarboxylases sont des enzymes qui sont actives à pH acide ; le milieu d'étude sera donc acidifié par la fermentation du glucose puis réalcalinisé par l'action des décarboxylases sur le substrat qui est un acide aminé.

Les décarboxylases scindent les acides aminés avec formation de l'amine correspondante et libération de dioxyde de carbone selon la réaction suivante :



Ces enzymes sont dites induites et leur synthèse est favorisée par un pH acide allant de 3,5 à 5,5 et des conditions d'anaérobiose obtenues en recouvrant le puits d'huile de paraffine. Leur caractérisation se fera par la mise en évidence de la modification du pH du milieu lié à la production d'amine qui l'alcalinise.

Les enzymes recherchées le plus souvent sont :

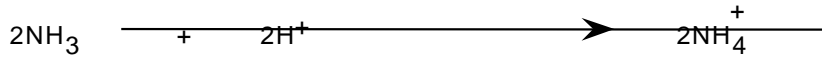
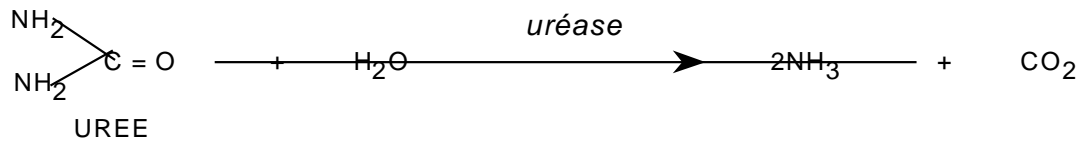
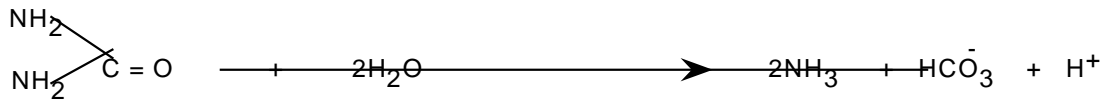
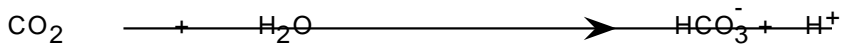
- l'ornithine décarboxylase (ODC)
- l'arginine dihydrolase (ADH)
- la lysine décarboxylase (LDC)

### **II-3-12- Production d'Uréase ( 25 )**

Les bactéries hydrolysent toute l'urée mais seules celles ayant une uréase constitutive, c'est à dire dont la synthèse est indépendante de la présence du substrat, vont arriver à alcaliniser le milieu, entraînant le virage de l'indicateur coloré

L'uréase est également une enzyme inductible.

La recherche de l'uréase repose sur la libération d'ions ammonium qui alcalinisent le milieu, entraînant le virage du rouge de phénol du jaune au rouge cerise.

EQUILIBREALCALINISATIONALCALINISATION AVEC VIRAGE DE L'INDICATEUR COLORE

Les souches de *S. epidermidis*, *S. intermedius* et la plupart des souches de *S. saprophyticus* sont uréase positive.

### II-3-13- Production de la bêta-galactosidase ( 25 )

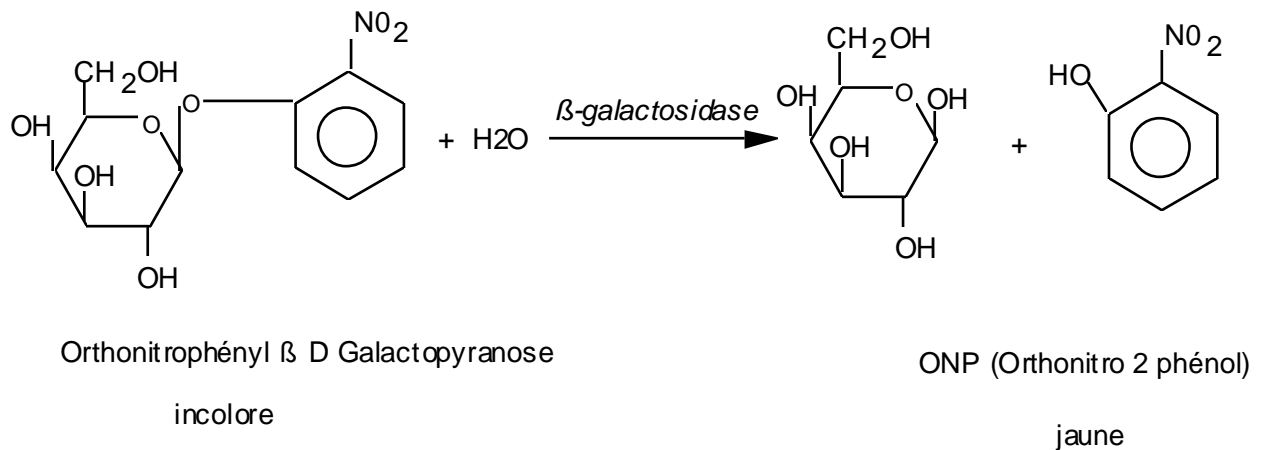
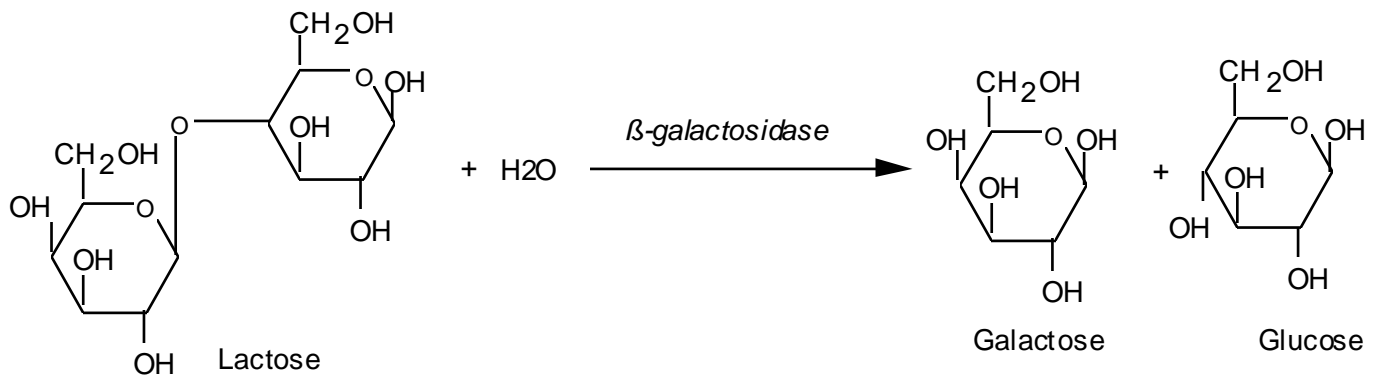
La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme bactérienne inductible, existant à un niveau de base dans le milieu intracellulaire, capable de scinder la molécule de

lactose en sucres simples que sont le glucose et le galactose après avoir traversé la paroi cellulaire sous l'action de la bêta-galactosidase perméase.

Le terme ONPG hydrolase est plus à propos que celui de bêta galactosidase dans la mesure où il précise que le substrat utilisé est l'ONPG et non le lactose. En effet, il existe des germes qui reconnaissent l'ONPG du côté du nitro-2-phénol et non de celui du bêta-galactoside. Ces germes ont donc une activité ONPG hydrolase tout en ne fermentant pas le lactose

Le test à l'ONPG est une technique relativement simple, basée sur l'action directe de l'enzyme sur une molécule chromogène pouvant être l'ortho-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside, ou le 2-naphtol-bêta-D-galactopyranoside. Ceux-ci sont utilisés comme substrats et libèrent respectivement l'orthnitrophénol jaune et le bêta-naphtol qui se combine au sel de Fast blue B en solution dans le 2-méthoxyéthanol pour donner une coloration rouge pourpre.

Les réactions chimiques mises en jeu peuvent être décrites de la façon suivante :



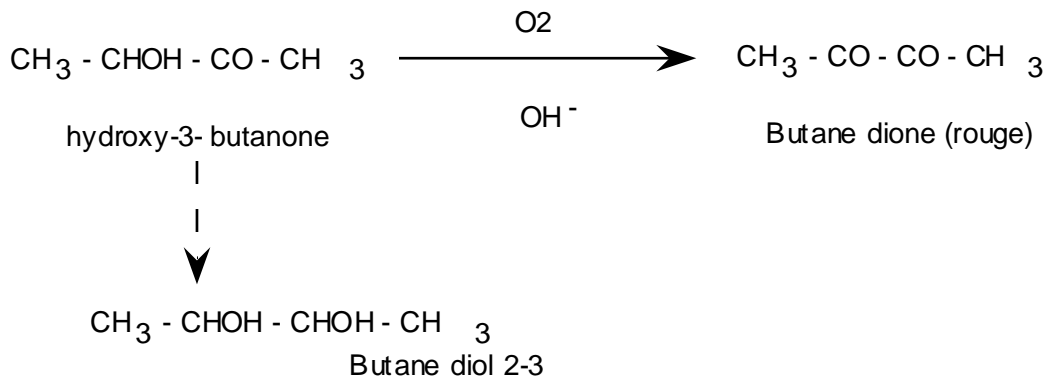
Ce test est positif pour *S. intermedius*, la plus part des souches de *S. saprophyticus* et *S. xylosus*.

Par contre les souches de *S. schleiferi* sont faiblement positives ou ont une positivité retardée.

### II-3-14- Production d'acétoïne

Les micro-organismes produisent lors de leur métabolisme, de nombreux produits de dégradation qui comme dans le cas ci-présent peuvent être recherchés.

L'acétoïne en langage courant, ou hydroxy-3-butanone ou encore dans la nomenclature ancienne acétyl-méthyl-carbinol (AMC) est un produit de dégradation du glucose au cours de la fermentation 2-3 butylène glycolique en passant par l'acétolactate et le diacétyl. Elle peut également être obtenue par condensation de deux molécules de pyruvate.



Par cette technique, la mise en évidence de l'acétoïne est certes effective, celle de l'alcool et de la diacétone correspondante est réelle et non négligeable.

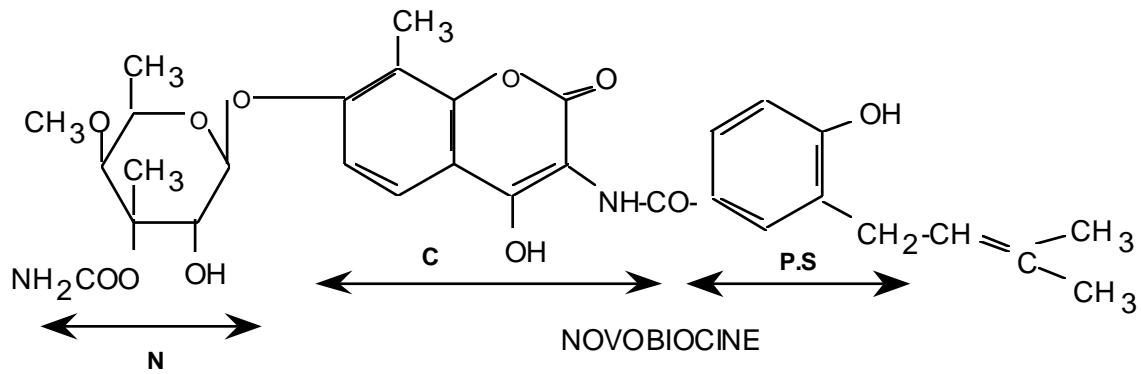
Il existe entre autres, la méthode conventionnelle de Voges-Proskauer miniaturisée ou non, incorporée aux méthodes biochimiques d'identification des staphylocoques du commerce

### II-3-15- Résistance à la Novobiocine

Les staphylocoques coagulase négative sont habituellement classés selon le critère de sensibilité ou de résistance à la novobiocine. (30)

La novobiocine est un antibiotique bacteriostatique peu utilisée en thérapeutique, pouvant s'avérer très actif sur les bactéries à Gram positif, en particulier les staphylocoques. Son action consiste en l'inhibition de la réplication de l'acide désoxyribonucleique (ADN), ce qui empêche la fixation de l'ATP sur la sous-unité B de l'ADN-gyrase, phénomène fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement de cette enzyme. Ainsi, son action se limite à la sous-unité B, contrairement à celle des quinolones qui s'étend à la sous-unité A avec pour conséquence le relachement du sur-enroulement et le clivage de l'ADN (30).

La structure de la novobiocine dérive de la coumarine et elle présente dans sa formule un sucre : le novobiose, et un phenol substitué.



N = Novbiose  
 C = coumarine  
 P.S = phénol substitué

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antibiotique est supérieure ou égale à 1,6 $\mu$ g /ml. Ainsi les souches de staphylocoques se développant dans un bouillon contenant une quantité de novobiocine à cette concentration ou ayant sur gélose un diamètre d'inhibition inférieur ou égale à 15mm pour un disque chargé de 5 $\mu$ g de l'antibiotique sont dites novobiocine résistantes. Ce sont généralement les souches de *S. saprophyticus*, de *S. cohnii cohnii*, *S. cohni urealyticum* et *S. xylosus*.

### II-3-1-6- Résistance à la Méthicilline

La recherche de la résistance à la méthicilline ou recherche des souches methi-R est essentielle dans l'antibiothérapie anti-staphylococcique. En effet ce sont des souches qui présentent une multi-résistance simultanée à la plupart des antibiotiques actifs sur les staphylocoques, notamment l'érythromycine, la clindamycine, les tétracyclines, le chloramphénicol, la gentamycine, les bêta-lactamines en général (25).



### II-3-17- Réduction des Nitrates

Les composés oxygénés de l'azote peuvent être utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons dans les chaînes d'oxydo-réduction cellulaires.

La réduction des nitrates et des nitrites constitue un des caractères taxonomiques importants chez les staphylocoques lors de leur identification. Ce test permet d'étudier la réaction de réduction des nitrates en nitrites sous l'action de la nitrate réductase de type B (NRB) produite par certains staphylocoques

La réaction sera mise en évidence par l'addition d'acide sulfanilique et d'alpha-naphtylamide qui révèlent la présence de l'ammoniaque libéré

## III- SUBSTANCES ELABOREES

Les staphylocoques, particulièrement *S. aureus* produisent une grande variété de protéines antigéniques dans le milieu extra cellulaire.

Ces protéines sont douées soit d'une activité toxique, soit d'une activité enzymatique et contribuent à la pathogénéicité des staphylocoques en s'attaquant aux tissus de l'organisme au niveau intra cellulaire, comme au niveau de la membrane cytoplasmique (14).

Ces protéines sont synthétisées pendant la phase exponentielle de croissance ou au début de la phase stationnaire (25).<sup>2</sup>

Il a été possible de mettre en évidence 12 à 14 protéines différentes avec des souches pathogènes de *S. aureus* récemment isolées (14, 25).

### III-1- TOXINES STAPHYLOCOCCIQUES

#### III-1-1- Les hémolysines

Quatre hémolysines différentes ont été identifiées et elles produisent toutes une bêta hémolyse claire, mais elles diffèrent de par leur mécanisme d'action et leur spécificité d'action sur les hématies (humaines et animales). Une souche va produire plus d'un type d'hémolysine qui vont s'attaquer aux cellules tissulaires entraînant ainsi une nécrose locale et la mort des animaux de laboratoire (25).

### ☞ L'alpha-hémolysine ou alpha-toxines

Produite par 80 à 90 % des souches de *S. aureus*, elle est la principale hémolysine des souches retrouvées chez l'homme. Elle est active sur les hématies de lapin à 37°C et inactive sur les hématies humaines.

L'alpha-toxine entraîne la production d'antitoxine qui empêche la fixation bactérienne sur la membrane cellulaire et peut être transformée en anatoxine (14, 25).

### ☞ Béta-hémolysine ou béta-toxine

Observée surtout chez les souches animales, elle est active sur les hématies de mouton. Son activité hémolytique est de type "chaud-froid" (inactive à 37°C et active à 4°C) (5, 6).

### ☞ Gamma-hémolysine ou gamma-toxine

Elle est constituée de deux protéines de base agissant de concert et qui diffèrent par leur masse moléculaire et leur point isobestique (14, 25).

Elle est active sur les hématies de lapin, de mouton, d'homme mais inactive sur les hématies de cheval. Elle est cependant inhibée par l'agar, certains polymères sulfatés, le cholestérol et bien d'autres lipides.

Elle présente une activité antigénique chez l'homme (14, 25).

### ☞ Delta-hémolysine ou delta-toxine

Produite par la plupart des souches humaines, elle est active sur les hématies de lapin, de cheval, d'homme et de cobaye.

Elle est inhibée par le sérum sanguin, le fibrinogène et les globulines (14, 25).

### III-1-2- La leucocidine de Panton et Valentine

Produite par la plupart des souches de *S. aureus*, elle agit uniquement au niveau des granulocytes, des macrophages et des basophiles de l'homme et du

lapin. C'est une protéine constituée de 2 composants F et S qui agissent en synergie sur la membrane cellulaire et vont entraîner la lyse de la cellule.

Elle est antigénique et est donc inductrice de la synthèse d'anticorps chez les sujets contaminés (14, 25).

### **III-1-3- L'exfoliatine ou épidermolysine**

Il existe deux types d'exfoliatine: Le type A, le plus fréquent, qui est d'origine chromosomique et le type B, qui est d'origine plasmidique.

Elles sont responsables de différentes formes de staphylococcies cutanées bulleuses dont la plus typique est "le syndrome de la peau ébouillantée".

### **III-1-4- Les entérotoxines staphylococciques.**

Fabriquées par certaines souches de *S. aureus*, elles sont au nombre de 8 (A, B, C, C1, C2, C3, D et E) et sont immunologiquement distinctes.

Les souches productrices d'entérotoxines sont responsables d'intoxications alimentaires et d'entérocolites pseudomembraneuses.

### **III-1-5- Toxine du syndrome du choc toxique staphylococcique**

Produite par quelques 15% des souches d'origines humaines, elle est d'origine chromosomique et est surtout observée avec les souches fortement protéolytiques mais peu ou pas hémolytiques, résistantes à la pénicilline G, ou cadmium ( $Cd^{2+}$ ) à l'arsénate ( $AsO_4^{2-}$ ).

## **III-2- ENZYMES STAPHYLOCOCCIQUES.**

### **III-2-1- La coagulase libre.**

Elle est capable de coaguler en quelques heures le plasma humain ou de lapin citraté, héparine ou oxalaté; c'est une enzyme d'origine chromosomique dont l'action est indépendante du calcium et du fibrinogène mais nécessite la présence d'un facteur appelé " coagulase reacting factor " qui est une globuline voisine de la prothrombine.

Il existe 7 groupes antigéniques entraînant la formation d'anticorps capables d'empêcher son activité biologique, et jouant un rôle dans la pathogénéicité en ayant un rôle antiphagocytaire.

La coagulase libre est produite par *S. aureus*, mais également par *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini* et *S. schleiferi coagulans* (14)

### **III-2-2- La coagulase liée ou clumping factor**

Elle est fixée à la surface de presque toutes les souches d'origine humaine; elle est diffusible dans le milieu de culture après autolyse et réagit directement avec le fibrinogène ou avec des monomères solubles de fibrine.

Elle intervient également dans la pathogénéicité des staphylocoques (14).

### **III-2-3- La fibrinolysine.**

C'est une staphylokinase qui métabolise le plasminogène en plasmine et qui agit sur le plasma de lapin, d'homme, de cobaye et de chien.

Elle est généralement produite par les souches humaines et du point de vue génétique, sa synthèse sera codée par un gène d'origine chromosomique ou plasmidique.

### **III-2-4- Les lipases.**

Elles sont au nombre de 3 : les lipases, les phosphatases et les estérases.

Les phosphatases sont localisées sur la membrane cytoplasmique au niveau de l'acide teichoïque. Ce sont les phosphatases alcalines et acides, ayant des pH optimaux respectifs de 10,8 et 5,2 et dont seule la phosphatase acide est partiellement libérée dans le milieu et peut donc être recherchée.

### **III-2-5- Les protéases.**

Elles sont également au nombre de 3 : la sérine protéase, la métalloprotéase et la thiolprotéase

### **III-2-6- La nucléase.**

Elle a une activité exo et endonucléasique sur l'ADN mais également sur l'ARN et elle est active à pH alcalin en présence de calcium.

Il existe cependant une désoxyribonucléase thermolabile très répandue et une enzyme thermostable dite thermonucléase qui elle, n'est produite que par

les souches de *S. aureus* et environ 5 % des souches coagulases négatives appartenant aux espèces : *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* (14).

### III-2-7- Le lysozyme et la lysostaphine.

Le lysozyme est une endo-bêta-N-acétylglucosaminidase qui provoque la lyse de la paroi bactérienne .

La lysostaphine est elle produite par *S. simulans biovar staphylolyticus* et est constituée de trois enzymes qui agissent respectivement au niveau de la chaîne tétrapeptidique entre l'acide N-acétyl muraminique et la L-alanine, au niveau de la chaîne polysaccharidique et au niveau des ponts polyglycines spécifiques aux staphylocoques.

### III-2-8- La hyaluronidase

C'est une enzyme qui hydrolyse l'acide hyaluronique et qui joue un rôle dans la pathogénécité des staphylocoques en favorisant sa diffusion dans le tissu conjonctif (14).

## IV- CARACTERES ANTIGENIQUES.

Il existe trois groupes d'antigènes somatiques chez *S. aureus*: trois antigènes pariétaux caractéristiques de l'espèce qui sont le peptidoglycane, la protéine A et les acides téichoïques; des antigènes pariétaux de type et des antigènes de surface .

### IV-1- LES ANTIGENES PARIETAUX.

#### IV-1-1- Le peptidoglycane.

Constitué d'un enchainement linéaire de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique. Ces différentes chaînes sont réunies par des liaisons bêta 1-4 et bêta 1-6. Les tétrapeptides de 2 chaînes sont reliés par un pont penta ou hexaglycine au niveau de la L-lys et de la D-Ala de chaque tétrapeptide respectivement.

On distingue trois déterminants antigéniques : la chaîne polysaccharidique, le tétrapeptide et le pont interpeptidique qui perdent une grande partie de leur pouvoir immunogène après purification du peptidoglycane.

Le peptidoglycane a une activité adjuvante et mitogène sur les lymphocytes B et pourrait induire les cellules immunosuppressives. Il est reconnu comme étant responsable d'effets toxiques semblables à ceux observés avec l'endotoxine.

#### **IV-1-2-La protéine de type.**

Holoprotéine élaborée par 90 p 100 souches de *S. aureus* d'origine humaine, elle l'est également par toutes les souches coagulase négative possédant une thermonucléase.

Sa structure est subdivisée en deux régions fonctionnellement distinctes dont la région N-terminale qui se fixe sur les IgG au niveau de leur fraction Fc. Cette propriété lui permet d'interférer avec le système immunitaire, ce qui explique son utilisation en thérapeutique pour réduire le taux des immuns complexes circulants.

Elle active le complément et déclenche la réaction inflammatoire; induit l'hypersensibilité retardée et immédiate, et est mitogène et cytotoxique (14, 17, 34).

#### **IV-1-3-Les acides teichoïques.**

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, unis par des liaisons phosphodiester et substitués selon le cas par la N-acetylgalactosamine ou N-acetylglucosamine. Ils sont fixés sur le peptidoglycane par une liaison bêta-1-6 entre le NAG de l'acide teichoïque et le NAM du peptidoglycane.

Les acides glycol teichoïques sont retrouvés chez tous les staphylocoques à l'exception de *S. aureus*, *S. xylosus* et *S. saprophyticus* chez lesquels on retrouve l'acide ribitol teichoïque.

Leur activité biologique est peu connue, mais ils sont immunogènes (14, 34).

#### **IV-2- LES ANTIGENES PARIETAUX DE TYPE.**

Toutes les souches de *S. aureus* possèdent des antigènes de type qui sont recherchés lors de la sérotypie par des réactions d'agglutination (14).

Il existe près de 30 facteurs qui ont suscité la mise au point de deux classifications qui diffèrent par la méthode biologique utilisée :

- la classification de Pillet utilise 14 immunosera pour l'identification des sérotypes I, II, III, 6, 7, 9, 10, 11 / I, 11/II, 14, 15, 17, 18, 66438 ; et une même souche peut donner une réaction d'agglutination positive avec plusieurs immunosera.

- la classification de Oeding utilise des méthodes plus sensibles telles que la chromatographie pour déterminer la structure et la nature protéique ou glycoprotéique de l'antigène (14).

#### **IV-3- LES ANTIGENES DE SURFACE OU ANTIGENES CAPSULAIRES.**

Les souches de *S. aureus* peuvent posséder soit une capsule vraie, soit une pseudocapsule ou microcapsule.

La capsule vraie, visible en microscopie optique après coloration négative par l'encre de chine est retrouvée chez les souches M, Smith et T.

La pseudocapsule qui est une fine couche polysaccharidique externe dénommée "Slime" n'est pas visible en microscopie optique (13, 14, 17, 34).

Le slime est une substance amorphe entourant la bactérie et lui conférant une propriété d'adhésion aux surfaces extérieures. Il peut être obtenu dans des conditions particulières de culture, notamment sur du matériel en plastique. Il se distingue de la capsule par la morphologie, mais également par sa structure chimique.

Ces antigènes sont constitués d'acides uraniques acétylés ou aminés avec 11 types sérologiques dont les types 5 et 8 sont les plus fréquents en clinique humaine.

### **V - CARACTERES GENETIQUES**

Le génome des staphylocoques est constitué d'un chromosome et d'éléments génétiques accessoires tels que les plasmides. Les transposons, les prophages et certaines insertions d'ADN hétérologues localisées au niveau du chromosome (34)

#### **V-1- LE CHROMOSOME STAPHYLOCOCCIQUE.**

De conformation circulaire, il est constitué de groupes de liaisons (**7, 12, 25**) dans lesquels sont individualisés des gènes qui codent pour différents caractères : la virulence, les récepteurs bactériophagiques, la production de pigment, l'antibiorésistance (**14, 34**).



## **V-2- LES PLASMIDES.**

Ce sont les principaux porteurs de l'antibiorésistance chez les staphylocoques; ils sont classés en 3 groupes en fonction de leur taille :

- de 2,5 à 5 Kb avec plusieurs copies codant chacune pour la résistance à un antibiotique donné et pouvant être transmis à d'autres genres bactériens : Bacillus, Streptococcus.
- de 25 à 35 Kb avec deux à dix copies cellulaires non transférables.
- de 40 à 60 Kb récemment décrits et pouvant être transmis par conjugaison (34).

## **V-3- LES TRANSPOSONS.**

Il en existe plusieurs chez *S. aureus* et sont généralement des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être liés aux plasmides ou intégrés au chromosome.

## **V-4- LES PROPHAGES.**

Ils confèrent à la plupart des souches de *S. aureus* qui les possèdent un caractère lysogénique permettant la caractérisation épidémiologique des souches (14)

Ils portent des gènes qui participent aux échanges génétiques et qui codent la synthèse de la staphylokinase et de l'entérotoxine A entre autres (14, 34).

## **V-5- LES ECHANGES GENETIQUES.**

Les staphylocoques participent à plusieurs échanges génétiques ayant des mécanismes classiques ou particuliers et propres aux staphylocoques.

### **V-5-1- La transduction.**

Effectuée par les groupes sérologiques B et parfois F et les groupes phagiques I et III, rarement II. Elle concerne les gènes plasmidiques et chromosomiques à la fois.

### **V-5-2- La transformation.**

L'état de compétence nécessaire à la transformation est lié à la présence du phage P11 chez la souche réceptrice (souche 8325), ce qui rend ce mécanisme particulier chez les staphylocoques.

### **V-5-3- la conjugaison.**

Les transferts par conjugaison ont été démontrés pour les plasmides, entre les staphylocoques et *Streptococcus pneumoniae* d'une part, entre staphylocoques et *Entérocooccus faecalis* d'autre part.

La conjugaison concerne également les gènes chromosomiques (14).

## I- MISE AU POINT DE LA MICROMETHODE

### I-1- MATERIEL.

#### I-1-1- Souches staphylococciques de référence.

Des souches de référence ont pu être sélectionnées pour chaque espèce staphylococcique citée çï-après :

*S. aureus*  
*S. epidermidis*  
*S. haemolyticus*  
*S. xylosus*  
*S. saprophyticus*  
*S. hominis*  
*S. intermedius*  
*S. warneri*  
*S. simulans*

Ces souches de staphylocoque ont été sélectionnées sur un pool de souches de chaque espèce qui ont été auparavant biotypées en macrométhode sur Cystéine Trypticase Agar (CTA) pour l'étude de l'assimilation des sucres et en tubes à hémolyse pour l'étude des autres caractères biochimiques puis cinq fois en microméthode

N'ont été retenues que les souches présentant des caractères biochimiques stables lors de ces différentes identifications.

#### I-1-2-Matériel et réactifs

##### Matériel

La microméthode nécessite le matériel suivant :

- agitateur mécanique
- balance de précision
- pHmètre
- seringue
- filtres de 0,2µl de diamètre
- micropipettes
- embouts stériles
- flacons en verre avec bouchon à vis de 5, 100, et 150 ml
- tubes stériles à bouchon de 2,5 et 5 ml
- Erlen Meyer

- papier d'emballage

### **Reactifs et milieux nécessaires**

#### **Réactifs**

- solution de potasse à 40%
- solution d'alpha-naphtol à 6% dans de l'alcool à 90°
- solution d'acide sulfanilique à 0,8% dans de l'acide acétique 5N
- solution d'alpha naphtylamine

#### **Milieux**

- milieu urée-tryptophane
- milieu de Falkow
- solution d'ortho-nitro-phényl-β-D-galactopyranoside (ONPG)
- milieu de Clark et Lubs
- MEVAG : milieu pour la mise en évidence de la voie d'attaque des glucides
- glucides : glucose, tréhalose, mannitol, xylose, saccharose, glycérol, mannose, lactose, raffine
- bouillon Mueller-Hinton
- solution de novobiocine à 3,2 µg/ml
- bouillon nitraté

### **Préparation des différents milieux**

#### **Milieu Urée-tryptophane**

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
-L-tryptophane	0,6 g
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
-K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
-Nacl	1 g
-urée	4 g
-alcool 95°	2 ml
-rouge de phénol	0,03 g
-eau distillée	qsp 100ml

Stériliser par filtration et conserver à 4°C.

### □ Milieu de Falkow

C'est le milieu de base pour la recherche des décarboxylases

Le milieu de Falkow, commercialisé sous forme déshydratée, a la formule de base suivante :

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
-extrait de levure	0,06 g
-glucose	0,2 g
-NaCl	1 g
-rouge de phÈnol	0,03 g
-acide aminé	1 g
-eau distillée	qsp 100 ml

Le milieu ainsi préparé doit être autoclavé à 120° C pendant 15 mn et son pH, ajusté à 6,3-6,4.

Il faut prévoir 2 lots auxquels on ajoute respectivement la L-arginine monochlorhydrate à 1% et la L-ornithine monochlorhydrate à 1%, et un lot témoin qui est exempt d'acide aminé.

### □ Test à l' ONPG

Il concourt à la caractérisation de la  $\beta$ -galactosidase.

La prÈparation du milieu nécessite l'utilisaton d'une solution tampon dont la formule est la suivante :

1-Solution tampon de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  à pH 7 :

-Eau distillée	6 ml
- Soude 1N	15 ml
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13,8 g

2-Solution d' ONPG M/75 ( à ajouter à la solution tampon )

-ONPG	160 mg
-Eau distillée	15 ml à 50° C

Laisser refroidir

-solution tampon	10 ml
------------------	-------

La solution obtenue doit être incolore, et elle sera conservée à 4° C et sa température ramenée à 37° C avant l'emploi afin de remettre le phosphate en solution .

#### □ Milieu de Clark et Lubs

Le but de son utilisation est la mise en évidence de l'acetoïne produite par certains staphylocoques .

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
- Peptone tryptique ou polypéptone	1,4 g
-Glucose	1 g
-Phosphate dipotassique	1 g
-Eau distillée stérile	qsp100 ml

-Dissoudre le mélange en chauffant légèrement.  
-Ajuster au pH 7,3 à 7,7

-Autoclaver à 110 °C pendant 30 mn ou filtrer à l'aide d'une membrane filtrante millipore.

#### □ Milieu M.E.V.A.G

L'utilisation du milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides permet de mettre en évidence le métabolisme glucidique, spécifique d' une souche bactérienne. Ce milieu est préparé de la façon suivante:

<u>Réactifs:</u>	<u>Quantités</u>
-phosphate d'ammonium	0,2 g
-chlorure de potassium	0,04 g
-sulfate de magnésium	0,04 g
-extrait de levure	0,2 g
-rouge de phénol	0,03 g
-glucide	2 g
-eau distillée	qsp100 ml

Le mélange obtenu sera autoclavé à 115° C pendant 15mn et son pH ajusté à 6,9-7,3

**Bouillon Muller-Hinton pour le test à la Novobiocine**

Le milieu de base peut être préparé à partir du milieu déshydraté commercialisé ou à partir de la formule suivante :

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
-Infusion de viande de bœuf	1,2 g
-hydrolysate de caséine	2,5 g
-amidon	0,3 g
-rouge de phénol	0,03 g
-glucose	2 g
-eau distillée	qsp 100 ml

le pH du bouillon MH doit être ajusté à 7,2-7,6 et le milieu sera stérilisé par autoclavage à une température de 121<sup>o</sup>C pour une durée de 15 mn .

Une fois le milieu refroidi, ajouter 100µl d'une solution de novobiocine de concentration 32µg/ml préparée extemporanément, à 1 ml du bouillon MH de manière à obtenir une solution finale de 3,2µg/ml de solution.

**Bouillon nitraté**

Ce milieu est utilisé afin de mettre en évidence la réduction des nitrates et des nitrites. Cette réaction nécessite l'utilisation des réactifs de révélation que sont : l'alpha-naphtylamide et l'acide sulfanilique. Sa formule est la suivante:

<u>Réactifs</u>	<u>Quantités</u>
-infusion cœur-cerveau	5 g
-glucose	0,2 g
-nitrate de potassium	2 g
-eau distillée	qsp 100 ml

Le pH du milieu sera ajusté à 7-7,4 et il sera stérilisé par autoclavage à une température de 115 °C pendant 15 mn.

**Milieus complémentaires**



Ce sont : la gélose à l'ADN et le plasma citraté qui servent à la recherche de la production de la DNase et de la coagulase.

## I-2-METHODOLOGIE.

### I-2-1-Matériel

#### Matériel de paillasse

Il est nécessaire de réunir le matériel suivant :

- une microplaque munie de dix-sept puits ayant une capacité de 300 à 400  $\mu$ l chacun
- une micropipette calibrée à 75  $\mu$ l
- des embouts stériles
- un bécher rempli d'Eau de Javel (hypochlorite de sodium)
- un plateau (inoxydable de préférence)
- un papier buvard
- un étalon de Mac Farland d' échelle 1 et 2
- de l'eau physiologique à pH neutre, stérile
- une anse de platine
- de l'huile de paraffine

#### Matériel de laboratoire

Cette technique nécessite également le matériel lourd suivant:

- un bec bunsen
- une étuve à 37 °C et à 42 °C
- une hotte à flux laminaire horizontal (facultatif)
- un four à micro-ondes
- un Vortex
- un hygromètre digital
- un appareil de scellage
- une feuille en plastique
- une feuille en téflon

### I-2-2-Milieus liquides

#### Préparation de la microplaque

75 $\mu$ l de chaque milieu sont déposés dans le puits correspondant au niveau de la microplaque de façon extemporanée.



### Préparation de l'inoculum

Les souches conservées étaient régénérées dans un bouillon tryptcase soja à 37°C pendant 4 heures avant d'être repiquées sur une gélose trypticase soja enrichie par 5% de sang de mouton de cheval qui permettait d'obtenir des colonies de taille plus importante. Après 24 heures à 37°C à l'étuve. A partir de colonies bien isolées, et bien développées, la suspension bactérienne était préparée en les délayant dans de l'eau physiologique dont le pH aura été ajusté à 7.

La turbidité de la suspension était ensuite ajustée à l'échelle 2 de l'étalon standard de Mac Farland au sulfate de baryum.

La suspension homogénéisée par vortexage était alors prête à être utilisée

### Ensemencement et incubation

75µl de la suspension bactérienne préparée étaient déposés dans chaque puits de la microplaque. La plaque était ensuite soumise à une légère agitation afin d'homogénéiser les milieux. Les puits contenant l'urée et les décarboxylases étaient recouverts d'huile de paraffine afin de maintenir l'anaérobiose nécessaire aux réactions.

Il s'agit de déposer dans chaque puits de la microplaque préalablement stérilisée au four à micro ondes, à l'aide d'une micropipette, 75µl de chaque milieu selon la disposition suivante :

GLU	TRE	MAN	XYL	SAC
GLY	MNE	LAC	RAF	/
URE	ADH	ODC	TDEC	VP
ONPG	NOVO	NIT	/	/

GLU glucose  
MAN mannitol  
XYL : xylose

URE urée  
ODC Ornithine Décarboxylase  
TDEC : témoin des décarboxylases

ADH : Arginine Dihydrolase  
VP : Voges-Proskauer  
NIT nitrate

SAC : saccharose      LAC    lactose      RAF    raffinose  
 GLY : glycérol      TRE : tréhalose      NOVO : novobiocine  
 MNE : mannose ONPG :ortho nitro phényl-β- D galactopyranose

La plaque était ensuite déposée sur un plateau recouvert d'un papier buvard imbibé d'eau du robinet, puis le tout était incubé à 37°C, température optimale de croissance des staphylocoques pendant 16, 18 et 24 heures.

### **I-2-3-Milieus deshydratés.**

#### **☞ Déshydratation des milieux**

Une fois les milieux répartis sur les microplaques. Celles-ci étaient placées à l'étuve à 37 et 42° C pendant une durée de 24 et 48 heures pour déterminer les conditions qui permettraient une dessiccation performante et rapide.

Au bout du temps déterminé pour chaque lot de plaques déshydratées, le taux d'humidité était relevé à l'aide d'un hygromètre digital .

#### **☞ Préparation de l'inoculum**

L'inoculum était préparé de la même manière que pour les milieux humides mais la turbidité était ajustée à l'échelle 1 de l'étalon Mac Farland.

#### **☞ Ensemencement et incubation**

150 µl de la suspension bactérienne étaient déposés dans chaque puits et la plaque ainsi inoculée sera homogénéisée par un mouvement circulaire puis incubé à 37° C pendant 16, 18 et 24 heures.

### **I-2-4-Lecture et interprétation des résultats.**

#### **☞ Matériel**

La lecture des résultats nécessite le matériel suivant :

- un bec bunsen
- solution de potasse
- solution d'alpha-naphtol
- solution d'acide sulfanilique
- solution d'alpha-naphtylamide

### Méthode

La lecture repose sur le changement de la coloration initiale des différents milieux .

Pour la plupart des milieux, la lecture se fait directement sans nécessiter l'utilisation de réactif de révélation ; par contre, il faut ajouter respectivement dans les puits contenant le VP et le nitrate, les réactifs suivants : une goutte de potasse à 40%, puis une goutte d'alpha naphthol à 6% et une goutte d'acide sulfanilique à 0,8%, puis une goutte d'alpha naphtylamine .

La lecture du nitrate doit se faire dans l'immédiat, alors que celle du VP nécessite une réincubation de 10 mn à 37°C à l'étuve .

**TABLEAU II : lecture de la microméthode**

SUBSTRATS	COLORATION		
	MILIEU D'ORIGINE	RESULTAT	
		<i>POSITIF</i>	<i>NEGATIF</i>
<b>Glucose</b>			
<b>Tréhalose</b>			
<b>Mannitol</b>			
<b>Xylase</b>			
<b>Saccharose</b>	Rouge	jaune	rouge
<b>Glycérol</b>			
<b>Mannose</b>			
<b>Lactose</b>			
<b>Raffinose</b>			
<b>Témoin</b>			
<b>Urée</b>	Orangée	Violet	Orangée
<b>ADH</b>	Orangée	Violet	Jaune
<b>ODC</b>	Orangée	Violet	Jaune
<b>TDEC</b>	Orangée	-	Jaune
<b>VP</b>	Doré	Rose	Beige
<b>ONPG</b>	Incolore	Jaune citrin	Incolore
<b>Novobiocine</b>	Rouge	Jaune	Rouge
<b>Nitrate</b>	Doré	Rouge framboise	Doré

Une fois le profil biochimique de la souche considérée déterminé, l'espèce était identifiée à partir du pedigree suivant

### **I-2-4-Evaluation de l'efficacité des milieux préparés**

Lorsqu'un lot de milieux était préparé, il était nécessaire de s'assurer de la stérilité et de l'efficacité des différents milieux.

#### **Stérilité**

Un millilitre de chaque milieu préparé était déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui étaient ensuite incubés à 37° C pendant 24 heures.

En l'absence de trouble, de virage de l'indicateur coloré et en l'absence de coloration du milieu après révélation pour l'acétoïne et la réduction des nitrates et nitrites, les milieux étaient considérés comme stériles.

Ce même test était effectué simultanément en microplaque de titration pour plus de sécurité.

#### **Efficacité**

Le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif avec une souche dont le caractère correspondant est positif et à donner un résultat négatif si ce caractère est négatif pour une autre souche donnée.

Pour chaque caractère biochimique, une souche de référence était choisie comme contrôle positif et une autre comme contrôle négatif. La répartition de ces contrôles positifs et négatifs était faite selon le tableau III :



**TABLEAU III : Témoins positifs et négatifs utilisés dans le contrôle d'efficacité des milieux**

	TEMOINS POSITIFS	TEMOINS NEGATIFS
GLUCOSE	<i>S. aureus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
TREHALOSE	<i>S. xylosus</i>	<i>S. epidermidis</i>
MANNITOL	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
XYLOSE	<i>S. xylosus</i>	<i>S. aureus</i>
SACCHAROSE	<i>S. aureus</i>	<i>S. cohnii</i>
GLYCEROL	<i>S. aureus</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
MANNOSE	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
LACTOSE	<i>S. xylosus</i>	<i>S. aureus</i>
RAFFINOSE	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>S. aureus</i>
UREE	<i>S. xylosus</i>	<i>S. haemolyticus</i>
ADH	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. xylosus</i>
ODC	<i>P. mirabilis</i>	<i>S. aureus</i>
VP	<i>S. aureus</i>	<i>S. xylosus</i>
ONPG	<i>S. xylosus</i>	<i>S. aureus</i>
NOVOBIOCINE	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>
NITRATE	<i>S. aureus</i>	<i>S. cohnii</i>

### I-2-5-Contrôle de qualité de la microméthode

#### Etude de la reproductibilité

Elle consistait en l'identification des mêmes souches de référence pour chaque lot de milieux préparés. Ces souches devaient présenter le même profil biochimique lors de l'identification par trois lots différents pour que la méthode soit considérée comme reproductible.



### Etude de la stabilité dans le temps

A partir du moment où la méthode était considérée comme stérile, efficace et reproductible, il s'agissait de déterminer le temps au bout duquel les milieux, à l'occurrence les milieux déshydratés restaient efficaces en donnant de bons résultats avec les témoins positifs et négatifs. Il s'agissait également de déterminer les conditions optimales de conditionnement et de conservation des plaques dans lesquelles les milieux ont été déshydratés.

Pour en arriver à la conclusion de la stabilité, il existait différents paramètres à étudier :

- Le conditionnement dans du Téflon ou dans du plastique hermétiquement fermé.
- La température de conservation qui pourrait être de +4° C et de -20° C.
- Le temps de conservation qui a été étudié à un mois, deux mois et trois mois.

Le protocole suivant a ainsi été adopté

protocole

### Evaluation du temps de réalisation

Pour rendre la méthode performante, il fallait qu'elle soit facilement réalisable ce qui permet un gain de temps lors de la manipulation.

Ainsi, la durée de la réalisation d'un test a été déterminée en chronométrant le temps mis par trois membres du personnel du laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

### Evaluation du coût d'un test

Le coût d'un test était évalué en déterminant la quantité nécessaire en chaque constituant pour une plaque puis en ramenant le coût aux prix et quantités commercialisées. La référence utilisée était le catalogue SIGMA 1990 (38) et le catalogue Polylabo (6) qui donnaient cependant des prix alignés sur le marché Français et des prix hors taxe.

Le prix de revient d'un test a été évalué en ne tenant compte que des milieux et réactifs nécessaires à sa réalisation.

## II- ETUDE COMPARATIVE.

### II-1- MATERIEL.

#### II-1-1- Echantillonnage

L'étude comparative a été menée sur des souches staphylococciques provenant de produits pathologiques dans lesquels ces staphylocoques avaient une implication pathologique et sur des souches collectées par écouvillonnage de peaux et de muqueuses de sujets sains. Cet écouvillonnage était effectué au niveau de l'oreille externe, des narines et du cuir chevelu qui sont les localisations qui permettaient d'obtenir le plus large éventail d'espèces de staphylocoques à l'état commensal.

Toutes ces souches ont été obtenues :

- des produits pathologiques du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Aristide Le Dantec arrivant au niveau du laboratoire de Bactériologie
- de peaux saines du personnel du Laboratoire de Bactériologie du CHU Aristide Le Dantec.
- durant la période allant d'Octobre 1995 à Mai 1996.

Sur un total de **41** souches staphylococciques, les espèces suivantes ont été identifiées :

*S. aureus*  
*S. epidermidis*  
*S. haemolyticus*  
*S. capitis capitis*  
*S. cohnii urealyticum*  
*S. simulans*  
*S. saprophyticus*  
*S. warneri*  
*S. schleiferi schleiferi*  
*S. hominis*  
*S. sciuri*

## II-1-2-Méthode classique ou minigalerie d'identification

Cette méthode utilise différentes réactions (32) qui sont :

- la croissance en milieu sélectif : le milieu de Chapman mannité
- la recherche de la catalase, de la DNase et de la coagulase.
- la recherche de l'assimilation de certains sucres que sont le xylose, le tréhalose, le mannitol, le saccharose sur le milieu CTA ou Cystéine Trypticase Agar.
- la recherche de la synthèse de certaines enzymes : l'uréase et la phosphatase
- la recherche de la sensibilité à la novobiocine

L'identification des espèces staphylococciques coagulase négative se faisait ensuite suivant le Tableau ci-après :

**TABLEAU IV : Galerie d'identification complémentaire des staphylocoques susceptibles d'être retrouvés dans des prélèvements d'origine humaine. (31).**

	TRE	XYL	SAC	MAN	URE	NOVO	PAL
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	-	d	-	+
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	+	+	+	+	-
<i>S. xylosus</i>	+	+	+	+	d	+	+
<i>S. cohnii</i>	+	-	-	+	+	+	d
<i>S. simulans</i>	+	-	+	+	+	-	d
<i>S. haemolyticus</i>	+	-	+	d	d	-	-
<i>S. hominis</i>	+	-	+	-	-	-	d
<i>S. warneri</i>	+	-	+	d	d	-	+
<i>S. capitis</i>	-	-	d	+	+	-	+

### **II-1-3- Microméthode commercialisée : API STAPH**

L'API STAPH est un système d'identification des Micrococcaceae reposant sur l'étude de 19 caractères biochimiques.

Les différents tests de cette galerie d'identification sont présentés sous une forme déshydratée.

La lecture et l'interprétation se faisaient avec la notice délivrée en même temps que le coffret par le fabricant (voir appendix).

L'indicateur coloré utilisé dans ce système est le rouge de phénol pour la mise en évidence de la production d'ammoniaque à partir de l'urée et de l'utilisation de l'arginine; de même que la production d'acide à partir des glucides suivants : glucose, mannitol, fructose, xylitol, mannose, melobiose, maltose, raffinose, lactose, xylose, tréhalose, saccharose, N-Acétyl-Glucosamine (NAG), Méthyl-D-Glucoside (MDG).

La procédure recommandée par le fabricant du coffret API STAPH a été suivie en ce qui concerne l'inoculation, l'incubation et la lecture de la microplaque d'identification.

Ainsi, les colonies de staphylocoques obtenues à partir d'une culture pure sur gélose Trypticase Soja Agar enrichie au sang de cheval à 5% étaient mises en solution dans 2ml du milieu de suspension : API STAPH MEDIUM. La turbidité de cette solution était ajustée à l'échelle 1 de l'étalon Mac Farland au sulfate de baryum.

Chaque puits était rempli de cette suspension et une fois l'urée et l'ADH recouvertes d'huile de paraffine stérile, la plaque était placée dans une boîte d'incubation imbibée d'eau, puis incubée à l'étuve à 37° C pour 18 à 24 heures avant d'être lue.

La détection du nitrate, de la phosphatase et de l'acétoïne nécessite respectivement les réactifs que sont : l'alpha naphthylamide (NIT1) et l'acide sulfanilique (NIT2), le ZYM A et le ZYM B ; le VP1 et le VP2 délivrés avec le coffret .

La lecture était faite conformément aux recommandations du fabricant.

Le profil biochimique obtenu était converti en un numéro code ou "code number", ce qui permettait de se référer au registre d'identification et de connaître directement l'espèce recherchée.

#### **II-1-4- Micromethode mise au point.**

Conformément au protocole de mise au point de la microméthode, celle-ci était utilisée pour l'identification des souches isolées.

#### **II-2- METHODOLOGIE.**

Il s'agissait de suivre les différentes procédures recommandées et celle adoptée par la microméthode pour identifier les mêmes souches provenant de l'échantillonnage de façon concomitante par les trois méthodes précitées :

- Méthode classique en minigalerie
- API SATPH
- Micromethode mise au point

Les résultats obtenus devaient être comparés de façon à conclure à la conformité ou non de l'identification des staphylocoques par les trois méthodes.



# I- MISE AU POINT DE LA MICROMETHODE

## I-1-CARACTERES BIOCHIMIQUES D'IDENTIFICATION

Les caractères biochimiques suivants ont été retenus lors de la mise au point de la microméthode :

- l'assimilation du glucose du tréhalose, du mannitol, du xylose, du saccharose, du glycérol, du mannose, du lactose et du raffinose
- la synthèse d'uréase, d'ADH, d'ODC, de nitrate réductase, de bêta-galactosidase
- la dégradation du glucose en acétoïne
- résistance à la novobiocine

## I-2- CHOIX DE L'INDICATEUR COLORE

La microméthode repose sur des réactions chromogéniques d'identification. Elle nécessite l'utilisation d'un indicateur coloré dont la zone de virage coïncide le plus possible avec les variations de pH des différents milieux lorsque les réactions sont positives.

Lors de la mise au point de la microméthode, le choix s'est porté sur le rouge de phénol à une concentration de **30mg%** pour l'étude de l'assimilation des hydrates de carbone, de la synthèse des différentes enzymes : décarboxylases et uréase.

## I-3- CONCENTRATIONS DES MILIEUX.

Il existe une composition standard des différents milieux recensés par la microméthode (**30**) pour l'identification des staphylocoques.

Cependant, dans le cadre de la mise au point de cette microméthode, l'étude de différentes concentrations des constituants des milieux s'imposait pour connaître la composition la plus économique permettant une bonne identification des staphylocoques.

Ainsi, il a été procédé à l'identification en milieu liquide et déshydraté des souches de référence avec des milieux une fois concentrés par rapport à la composition standard, puis avec des milieux deux fois, quatre fois, et quinze fois concentrés.

Les résultats obtenus en fonctions du milieu sont représentés par le Tableau V.

**TABLEAU V : Concordance de l'identification des souches de référence par rapport à la concentration et le type des milieux.**

	CONCENTRATIONS (C)			
	1C	2C	4C	15C
	(%)	(%)	(%)	(%)
MILIEUX LIQUIDES	80	100	80	0
MILIEUX DESHYDRATES	100	100	80	0

La concentration minimale permettant une identification optimale des souches staphylocociques a été arrêtée à des milieux :

- une fois concentrés par rapport à la composition standard des milieux **(30)** pour les milieux à déshydrater.

- deux fois concentrés pour les milieux liquides.

#### **I-4-CONCENTRATION DE LA SUSPENSION BACTERIENNE**

La concentration en bactéries de l'inoculum permettant une identification optimale des souches de référence correspond à la turbidité de l'échelle :

- 1, de l'étalon Mac Farland pour les milieux déshydratés

- 2, du même témoin pour les milieux liquides

#### **I-5- PEDIGREE DE LECTURE**

Le pedigree élaboré a permis de classer les caractères nécessaires à une bonne identification en caractères indispensables et en caractères secondaires, lorsque l'identification était réalisée par la microméthode mise au point. Ainsi, le Tableau VI exprime les caractères secondaires ou indispensables en fonction de l'espèce staphylococcique à rechercher.



**TABLEAU VI : Caractères secondaires (.) et indispensables (X) à l'identification des espèces staphylococciques**

	CARACTERES											
	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LAC	RAF	URE	ADH	ODO
<i>S. aureus</i>	X	.	X	.	X	X	.	X	X	.	.	X
<i>S. epidermidis</i>	X	X	X	.	.	X	.	.	X	X	.	.
<i>S. haemolyticus</i>	X	X	.	.	.	X	X	.	X	.	.	.
<i>S. xylosus</i>	X	.	.	X	.	X	.	.	.	.	.	.
<i>S. saprophyticus</i>	X	.	.	.	X	X	.	.	.	.	.	.
<i>S. hominis</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	.	.	.	.
<i>S. simulans</i>	X	X	X	.	.	X	.	.	X	.	.	.
<i>S. warneri</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	X	.	.	.
<i>S. cohnii cohnii</i>	X	X	.	X	.	X	.	.	X	X	.	.
<i>S. cohnii urealyticum</i>	X	.	.	X	.	X	.	.	.	X	.	.
<i>S. lugdunensis</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	.	.	.	.
<i>S. schleiferi schleiferi</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	X	.	.	.
<i>S. capitis capitis</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	X	X	.	X
<i>S. capitis urealyticus</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	X	X	.	.
<i>S. lentus</i>	X	.	.	.	.	X	.	.	X	.	.	.



Ce tableau montre la nécessité d'incorporer certains tests , ceux la même qui sont indispensables à l'identification ; ne serait-ce que celle d'une espèce staphylococcique.

Il montre également que des réactions telles que la recherche de l'ADH et du nitrate ne sont pas nécessairement sollicitées pour l'identification, même d'une seule espèce de staphylocoques.

### I-6- DELAI DE LECTURE.

Les résultats obtenus lors de l'étude du délai minimal de lecture peuvent être représentés sous forme de Tableau (Tableau VII)

**TABLEAU VII : Concordance (%) de l'identification en fonction du temps d'incubation.**

	IDENTIFICATION	CARACTERES
<b>16 HEURES</b>	100	99,3
<b>18 HEURES</b>	100	99,3
<b>24 HEURES</b>	100	99,3
<b>48 HEURES</b>	0	/

Dès la 16<sup>ème</sup> heure, l'identification des souches staphylococciques de référence a été effectuée à un taux de **100 %** de concordance et les caractères ont présenté une concordance de l'ordre de **99,3 %** (143 caractères sur 144), l'ADH restant négative pour les *S. xylosus* lors d'une des trois identifications.

A la 18<sup>ème</sup> heure, l'identification était toujours faite avec **100 %** de concordance et les caractères ont aboutit au même taux de concordance : **99,3%** ; l'ADH du *S. xylosus* avait alors viré mais le raffinose sensé être négatif était devenu positif.

A la 24<sup>ème</sup> heure, l'identification et les caractères étaient identiques à ceux obtenus à la 16<sup>ème</sup> heure.

Par contre, à la 48<sup>ème</sup> heure, la plus part des caractères ont abouti à des profils ininterprétables ; ainsi, tous les milieux contenant des hydrates de

carbone viraient et étaient donc positifs, ce qui ne correspondait à aucun profil existant, les décarboxylases s'alcalinisaient; le milieu de Clark et Lubs et le bouillon nitraté viraient au positif, de même que la novobiocine.

Il résulte de cette étude que dès la 16<sup>ème</sup> heure, l'identification des staphylocoques par la microméthode mise au point est possible après une incubation à 37°C avec un risque nul de mauvaise identification et un risque amoindri, s'agissant des caractères; mais que la lecture doit être effectuée dans un délai de 24 heures.

### **I-7- EVALUATION DES MILIEUX LIQUIDES.**

L'évaluation des milieux liquides préparés était effectuée avec les souches de référence qui devaient présenter le même profil biochimique après trois identifications par la microméthode.

Il ressort de cette évaluation que :

- sur 27 identifications au total, 23 ont été bien réalisées avec la microméthode, soit un taux de **85,2 %**. Alors que 4 identifications ont abouti à un profil discordant , soit un taux de **14,8 %**. Il n'y a eu aucun profil ininterprétable.

- sur 432 caractères au total, les réactions biochimiques ont abouti à un résultat concordant pour 405 d'entre eux, soit un taux de **93,75 %** de concordance contre 27 caractères discordants, soit un taux de **7,63 %**.

Parmi ces résultats discordants, seuls 5 étaient indispensables à une bonne identification des souches staphylococciques de référence ayant un profil discordant, soit un taux de **1,16 %** concernant le mannose, l'urée, et l'ONPG.

### **I-8- EVALUATION DES MILIEUX DESHYDRATES.**

#### **I-8-1- Détermination de la température et du temps de déshydratation.**

Il existe différentes méthodes de déshydratation, mais pour des raisons d'accessibilité au matériel, il n'a été étudié que la dessiccation à l'étuve à différentes températures et pendant un temps plus ou moins plus long. Ainsi, les résultats obtenus sont les suivants.

**TABLEAU VIII : Concordance de l'identification selon les conditions de déshydratation**

TEMPS	TEMPERATURE DE DESHYDRATATION		
	37°C	42°C	50°C
18 HEURES	100 %	100 %	0
24 HEURES	100 %	100 %	0
48 HEURES	77,88 %	77,88 %	0

La température de déshydratation à 37° C et 42° C donnent le même résultat quelque soit le temps d'incubation après 18 et 24 heures de déshydratation, temps au bout duquel la concordance est maximale : **100 %**. Cependant, si la déshydratation se prolonge à 48 heures, la novobiocine devient instable aboutissant à la mauvaise identification de *S. saprophyticus* et *S. xylosus* ce qui ramène le taux de concordance à **77,78 %**.

La meilleure température et la durée de déshydratation permettant une certaine économie lors de cette étape dans la mise au point de la microméthode sont : la déshydratation à **37°C** pendant **18 heures**.

Au bout de ce temps, le taux d'humidité résiduelle variait entre 30 et 35%

### **I-8-2- Evaluation.**

L'évaluation des milieux déshydratés était menée de la même manière qu'avec les milieux liquides et les résultats de cette évaluation peuvent être résumés sous forme de tableau de l'annexe 3. Il en résulte que :

- sur 27 identifications en milieux liquides, 23 ont été bien menées soit un taux de **85,2 %** de concordance. Par contre, 4 identifications ont abouti à une identification discordante, soit un taux de **14,8 %** et aucune identification n'a été ininterprétable.

- sur 432 caractères au total, il a été obtenu 399 discordants soit un taux de **92,37 %** et 33 caractères discordants, soit **7,63 %** caractères.



Parmi ces mauvais résultats, seuls 4 étaient indispensables à une bonne identification des souches staphylococciques de référence mal identifiées, soit **0,92 %** caractères. Ce sont :le Saccharose et l'ONPG.

### **I-9- COMPARAISON DES MILIEUX LIQUIDES ET DESHYDRATES.**

Elle était faite avec les résultats obtenus lors de l'identification des souches de référence. Les résultats obtenus sont dressés dans les Tableaux IX et X.

Les milieux liquides ont correctement identifié **85,2 %** des souches de référence considérées contre **85,2 %** avec les milieux déshydratés.

L'identification par les milieux humides a été discordante à un taux de **14,8%** du fait d'une mauvaise identification du *S. Haemolyticus* ; celui-ci a été identifié comme un *S. hominis* car le mannose et l'urée étaient positifs. Les milieux déshydratés ont présenté le même taux de discordance lors de l'identification des souches de référence ; et celles-ci concernent la souche de *S. saprophyticus* qui a été identifiée comme étant un *S. cohnii cohnii* avec une réaction du saccharose négative. Par contre la souche de *S. simulans* n'a pas été identifiée une seule fois par les milieux déshydratés ou par les milieux liquides. Cette discordance est directement liée à des réactions négatives de l'ONPG aboutissant à l'identification du *S. simulans* comme un *S. hominis* ou un *S. warneri*.

La discordance dans l'identification du *S. simulans* a été retrouvée dans les deux méthodes et pour le même caractère discordant : l'ONPG.

**TABLEAU IX : Concordance de l'identification selon la méthode utilisée.**

	<b>IDENTIFICATION (%)</b>	
	<b>Milieux liquides</b>	<b>Milieux déshydratés</b>
<b>CONCORDANTES</b>	85,2	85,2
<b>DISCORDANTES</b>	14,8	14,8
<b>ININTERPRETABLES</b>	0	0

**TABLEAU X : Concordance des caractères biochimiques selon la méthode utilisée.**

	<b>CARACTERES (%)</b>	
	<b>Milieux liquides</b>	<b>Milieux déshydratés</b>
<b>CONCORDANTS</b>	93,75	92,37
<b>DISCORDANTS</b>	6,25	6,71
<b>DISCORDANTS ET INDISPENSABLES</b>	1,16	0,92

## II- CONTROLE DE QUALITE

### II-1- REPRODUCTIBILITE

Les résultats obtenus lors de l'étude de la reproductibilité de la microméthode peuvent être représentés dans le Tableau XI.

Il a été procédé 9 identifications avec chaque lot de milieux ; et pour les 3 lots préparés il y a eu **100 %** de concordance.

Le lot 1 a présenté 5 caractères secondaires discordants qui n'ont affecté en rien l'identification des souches staphylococciques concernées soit sur 144 caractères, un taux de **3,47 %** de discordance.

Le lot 2 par contre n'a présenté que 2 caractères discordants et secondaires , soit un taux de **1,39 %** de discordance.

Le lot 3 a présenté le même taux de discordance que le lot 2 qui est de **1,39 %**.

**TABLEAU XI : Résultats de l'étude de la reproductibilité de la microméthode en % de concordance.**

	IDENTIFICATION (%)			CARACTERES (%)		
	LOT 1	LOT 2	LOT 3	LOT 1	LOT 2	LOT 3
<b>CONCORDANCES</b>	100	100	100	96,53	98,61	-
<b>DISCORDANCES</b>	0	0	0	3,47	1,39	1,39
<b>ININTERPRETABLES INDISPENSABLES</b>	0	0	0	0	0	0

La distribution et le type des caractères discordants peuvent être représentés dans le tableau suivant :

**TABLEAU XII : Distribution et type de discordance des caractères lors de l'étude de la reproductibilité**

ESPECES	LOTS DE PREPARATION		
	lot 1	lot 2	lot 3
<i>S. epidermidis</i>	SAC ADH	-	-
<i>S. xylosus</i>	LAC	-	URE
<i>S. saprophyticus</i>	-	VP	-
<i>S. intermedius</i>	ADH	ADH	-
<i>S. hominis</i>	-	-	ADH
<i>S. warneri</i>	ADH	-	-
<b>TOTAL</b>	5	2	2

Ainsi, sur 9 caractères discordants, 5 sont liés à l'ADH soit un taux de **55,56 %** et des taux de **11,11 %** pour le saccharose, le lactose, la réaction de Voges-Proskauer et l'urée, respectivement.

## II-2- STABILITE

L'étude de la stabilité des milieux lors de la conservation a abouti aux Tableaux XIII et XIV qui résument les résultats obtenus.

Les discordances dans l'étude de la stabilité concernent exclusivement la novobiocine et la réaction de Voges-Proskauer qui sont instables quelque soit la température, la durée de déshydratation et quelque soit le conditionnement si la conservation est faite à 4°C.

Le même phénomène est observé lors de la conservation à -20°C si la déshydratation est faite à 42°C et pendant 48h.

L'instabilité de la novobiocine a été notée quelles que soient les conditions de déshydratation, de conservation et de conditionnement.

**TABLEAU XIII : Concordance (nombre) des caractères sur un total de 16, lors de l'étude de la stabilité après une déshydratation à 42 °C.**

<b>RESULTATS</b>						
<b>DUREE DESHYDRAT</b>	<b>TEMPER. CONSERV</b>	<b>CONDITIONNEMENT</b>	<b>J30</b>	<b>J60</b>	<b>J90</b>	<b>CARACT DISCORD</b>
24 heures	- 20°C	plastique	15	15	15	NOVO
		Téflon	15	15	15	NOVO
	+4°C	plastique	14	14	14	NOVO +VP
		Téflon	14	14	14	NOVO +VP
48 heures	-20°C	plastique	14	14	14	NOVO +VP
		Téflon	14	14	14	NOVO +VP
	+4°C	plastique	14	14	14	NOVO +VP
		Téflon	14	14	14	NOVO +VP

**TABLEAU XIV : Concordance (nombre) des caractères sur un total de 16 lors de l'étude de la stabilité après une déshydratation à 37 °C.**

<b>RESULTATS</b>						
<b>DUREE DESHYDRAT</b>	<b>TEMPER. CONSERV</b>	<b>CONDITIONNEMENT</b>	<b>J30</b>	<b>J60</b>	<b>J90</b>	<b>CARACT DISCORD</b>
24 heures	- 20°C	plastique	15	15	15	NOVO
		Téflon	15	15	15	NOVO
	+4°C	plastique	14	14	14	NOVO +VP
		Téflon	14	14	14	NOVO +VP
48 heures	-20°C	plastique	15	15	15	NOVO
		Téflon	15	15	15	NOVO
	+4°C	plastique	14	14	14	NOVO +VP
		Téflon	14	14	14	NOVO +VP

### II-3- TEMPS DE REALISATION.

**TABLEAU XV : Détermination du temps de réalisation d'une identification avec la microméthode.**

	MH	MD
<b>T1</b>	6,5 mn	5 mn
<b>T2</b>	8 mn	3,5 mn
<b>T3</b>	7 mn	3,5 mn
<b>MOYENNE</b>	<b>7,17 mn</b>	<b>4 mn</b>

Il faut donc **4 minutes** pour manipuler les milieux déshydratés et presque le doubles, soit **7,17 minutes** pour manipuler les milieux liquides.

### II-4- COUT D'UNE IDENTIFICATION.

Le prix de revient d'une identification a été estimé à **1,14FF (33, 38)** lorsque les plaques et les embouts ne sont pas pris en compte, mais le coût de revient total est représenté dans le tableau XVI.

**TABLEAU XVI : Tarification du matériel nécessaire à une identification par la microméthode.**

	QUANTITES	TARIF HT (FF)
<b>Réactifs</b>	-	1,14
<b>Embouts</b>	20	0,4
<b>Plaque</b>	1	2,23
<b>Plastique ( emballage)</b>	15X15 cm	1,06
<b>TOTAL</b>	-	4,38

### III- ETUDE COMPARATIVE.

Sur un total de **41** souches staphylococciques identifiées par la microméthode mise au point comme le montre le Tableau XVII, il existe une concordance qui correspond à un taux de **92,68 %** lors de l'identification par la minigalerie classique (**38** souches) et à **80,49 %** lors de l'identification par l'API STAPH (**33** souches).

**TABLEAU XVII : Distribution (%) des souches de staphylocoques en fonction de la méthode d'identification**

ESPECES	METHODES (M)		
	MICROMETHODE	API STAPH	MGI
<i>S. aureus</i>	9	5 (55,5)	9 (100)
<i>S. epidermidis</i>	5	4 (80)	5 (100)
<i>S. cohnii</i>	5	5 (100)	5 (100)
<i>S. haemolyticus</i>	10	10 (100)	10 (100)
<i>S. capitis</i>	2	2 (100)	2 (100)
<i>S. simulans</i>	3	3 (100)	3 (100)
<i>S. saprophyticus</i>	1	0	1 (100)
<i>S. hominis/warneri</i>	4	3 (75)	3 (75)
<i>S. lugdunensis</i>	2	2 (50)	0
<b>TOTAL</b>	<b>41</b>	<b>3 (82,92)</b>	<b>38 (92,68)</b>
<b>INDETERMINEES</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>DISCORDANCES</b>	<b>-</b>	<b>6</b>	<b>3</b>

Deux souches ont donné un profil ininterprétable lors de l'identification avec le API STAPH alors que toutes les souches ont été identifiées par la

minigalerie classique d'identification biochimique (MGI) et par la microméthode mise au point.

Toujours en comparaison avec la microméthode, l'identification des souches staphylococciques a été discordante pour **6** d'entre elles avec l'API STAPH et pour **3** autres avec la minigalerie d'identification. Le type et la fréquence des discordances dans l'identification des souches de staphylocoque par les différentes méthodes utilisées sont mis en évidence par le Tableau XVIII.

Il ressort de ce tableau que les types de discordance varient d'une méthode à l'autre avec une fréquence plus marquée pour l'identification de *S. aureus* de la microméthode comme *S. hominis* par le API STAPH et de *S. lugdunensis* de la microméthode comme *S. hominis* par la minigalerie d'identification. Deux *S. aureus* de la microméthode ont été pris pour *S. scuri* et *S. haemolyticus* par l'API STAPH.

Un *S. hominis* ou *S. warneri* de la microméthode a été identifié comme un *S. capitis* par le API STAPH et celui de *S. haemolyticus* par la macrométhode.

Deux *S. capitis* identifiés par l'API STAPH se sont avérés être un *S. saprophyticus* et un *S. hominis* ou *S. warneri* lorsqu'ils étaient identifiés par la microméthodes.

S'agissant des caractères discordants, pour ceux qui existent en commun dans la microméthode mise au point et le API STAPH, la fréquence et les caractères sujet de discorde, sont représentés par le Tableau XIX.



TABLEAU XVIII : Type et fréquence des discordances lors de l'identification par les 3 méthodes.

METHODE	IDENTIFICATION PAR LA MICROMETHODE								
	<i>S. aureus</i>		<i>S. saprophyticus</i>		<i>S. Hominis ou warneri</i>		<i>S.</i>	<i>S. lugdunensis</i>	
	IDENT	%	IDENT	%	IDENT	%	IDENT	%	
API STAPH	<i>S. sciuri</i>	16,7	<i>S. capitis</i>	16,7	<i>S. capitis</i>	16,7	-		
	<i>S. haemolyticus</i>	16,7							
	<i>S. hominis</i>	33,4							
MGI					<i>S. haemolyticus</i>	16,7	<i>S. hominis</i>	33,4	

**TABLEAU XIX : Fréquence des caractères discordants en fonction de l'espèce entre la microméthode et le API STAPH**

	CARACTERES											
	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LAC	RAF	URE	ADH	OD
<i>S. aureus</i>										1	4	
<i>S. epidermidis</i>										1	1	
<i>S. Cohnii urealyti.</i>												
<i>S. haemolyticus</i>			1				1	1				1
<i>S. capitis capitis</i>			1									
<i>S. saprophyticus</i>												
<i>S. hominis ou S. warneri</i>		1	1		1		2	2	2	2	1	
<i>S. simulans ou S. lugdunensis</i>							1			1		
<b>TOTAL</b>		1	3		1		5	3	2	6	7	
<b>FREQUENCE (%)</b>		2,85	8,57		2,85		14,2	8,59	5,71	17,1	20	

## I-MISE AU POINT DE LA MICROMETHODE

### I-1-CARACTERES BIOCHIMIQUES D'IDENTIFICATION

Les caractères biochimiques constituant la microméthode ont été choisis à partir de la méthode de Kloos et Schleifer (25). Les caractères retenus étaient ceux qui étaient susceptibles de permettre une bonne identification et qui étaient indispensables à cette identification.

Ainsi, avec le pedigree établi, sur les 16 caractères retenus, seuls 2 étaient nécessaires au diagnostic du genre : le glucose et le glycérol et les 12 autres au diagnostic d'espèce : tréhalose, mannitol, xylose, saccharose, mannose, lactose, raffinose, urée, ODC, ONPG et la novobiocine. Cependant, 2 caractères ne sont pas directement impliqués dans l'identification, ce sont l'ADH et le nitrate.

Ce constat rejoint le choix de Kloos et Lambe (1,25) pour l'identification des espèces staphylococciques les plus couramment rencontrées en pathologie clinique. L'ADH n'y figure pas dans le schéma d'identification simplifié, car il n'a pas été jugé réellement nécessaire.

Par contre, l'étude de ces caractères est retrouvée dans la plupart des microméthodes existant sur le marché, à l'instar de l'API STAPH (30), du système MicroScan (21), du système Minitek modifié (10), du API STAPH-Ident system (27), du système AutoMicrobic d'identification des Gram positifs (3) et du Staf-sistem 18-R (36).

La novobiocine s'avère être un caractère clé pour classer les espèces staphylococciques en espèces résistants à la novobiocine à 1,6 µg/ml : *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii* (7, 15, 23, 25) et en espèces sensibles à cet antibiotique.

La DNase et la coagulase étaient des caractères complémentaires nécessaires à une bonne identification (3). En effet, la confusion était souvent faite, concernant la DNase, car, outre *S. aureus*, il existe d'autres espèces capables de produire cette endonucléase : ce sont : *S. lugdunensis*, qui sont facilement identifiables par leur capacité à synthétiser de l'ODC (25,36) et *S. schleiferi*. Cependant, parmi les souches staphylococciques d'origine humaine, *S. aureus* étant le seul producteur de coagulase avec certaines souches de *S. schleiferi schleiferi* (37), ce caractère biochimique permet une distinction sûre entre ces espèces et les autres producteurs de DNase.

Les hydrates de carbone dont l'assimilation était retenue lors de l'élaboration de la microméthode, ont tous démontré leur intérêt dans l'identification des staphylocoques comme en atteste le pedigree.

## **I-2- PREPARATION DES MILIEUX**

### **I-2-1- Choix de l'indicateur**

La microméthode, reposant sur des réactions biochimiques chromogènes, nécessitait l'utilisation d'un indicateur coloré. La zone de virage de cet indicateur devait coïncider avec la variation de pH des milieux en cas de réaction positive.

En effet, la zone de virage du BCP varie du pH 4 au pH 6,6 (30), ce qui nécessitait une grande quantité d'acide dans le milieu pour un virage franc de l'indicateur et ce qui rendait souvent la lecture et donc l'interprétation difficile.

Celle du rouge de phénol varie du pH 6,4 au pH 8,2.

Les milieux au CTA (30) utilisent comme indicateur coloré, le rouge de phénol pour étudier l'assimilation des hydrates de carbone de même que la plupart des microméthodes commercialisées (27, 32). Cependant, certaines méthodes telles que le API STAPH Ident System (18, 35), révèlent la présence des glucides par le BCP.

Les décarboxylases étaient détectées soit par le rouge de phénol (18, 27, 30), soit par le BCP (30).

Pour toutes les différentes réactions, le choix de l'indicateur coloré lors de la mise au point de la microméthode a porté sur le **rouge de phénol** qui a montré une plus grande stabilité lors de la conservation et lors de la déshydratation des milieux. Il présente surtout l'avantage de permettre une lecture facile, avec un virage franc de la coloration en cas de réaction positive.

### **I-2-2- Concentration des milieux**

La composition des différents milieux était donnée par **MARCHAL et coll (32)**.

La concentration minimale permettant une identification des staphylocoques a été arrêtée à :

- une solution une fois concentrée par rapport cette composition (30) pour les milieux à déshydrater

- une solution deux fois concentrée pour les milieux liquides car ils devaient être ensuite dilués au demi par l'inoculum.

Lorsque les milieux étaient plus concentrés, il se posait un problème de stabilité avec des sucres tels que le xylose et le mannitol mais également avec la novobiocine et le nitrate.

### **I-2-3- Concentration de la suspension bactérienne**

Après 16 heures d'incubation, les meilleurs résultats ont été obtenus avec un inoculum dont la turbidité était de :

- **1 Mac Farland** pour les milieux déshydratés
- **2 Mac Farland** pour les milieux liquides

Lorsque la turbidité était de 0,5 Mac Farland , l'identification requiert un temps d'incubation d'au moins 24 heures, ce qui ne répondait pas aux exigences actuelles d'une méthode d'identification des staphylocoques.

### **I-2-3- Délai de lecture**

Le délai de lecture des résultats variait selon la méthode. Le Tableau XX montre l'existence d'une corrélation directe entre :

- ce délai et la turbidité de l'inoculum
- ces deux paramètres et le taux de concordance lors de l'identification des staphylocoques par différentes méthodes en comparaison avec la méthode de Kloos et Schleifer (26).

**TABLEAU XX : Turbidité, délai de lecture et concordance des résultats en fonction de la microméthode considérée (3, 11, 10, 18, 21, 22, 27, 36)**

<b>METHODES</b>	<b>TURBIDITE (McF)</b>	<b>DELAI DE LECTURE</b>	<b>CONCORDA NCE</b>
<b>Rapidec Staph</b>	4	2	70,3-99
<b>Api Staph Ident System</b>	3	5	88-98
<b>AutoMicrobic System</b>	0,5	10,8	67,3
<b>Minitex System modifié</b>	1	18-24 h	88

<b>Staf Sistem 18-R</b>	1	18	93,9
<b>API ZYM</b>	-	48	-
<b>Microméthode</b>	1	16	85,2

Le Tableau XX montre que lorsque la turbidité est de 1 Mac Farland, le délai de lecture varie de 16 à 48 heures avec une concordance des identifications très acceptable, allant de **85,2** à **93,9%**.

Parallèlement à l'hypothèse selon laquelle il existe une corrélation entre ces trois paramètres, lorsque la turbidité est à 3 Mac Farland, le délai de lecture est réduit à 5 heures avec une concordance allant jusqu'à **98%** ; si elle est à 4 Mac Farland, le délai est encore réduit à 2 heures avec une concordance allant jusqu'à **99%**.

La conclusion qui en découle est qu'une augmentation de la densité de l'inoculum, permet de réduire au minimum le délai de lecture. Cette modification permettrait une identification aussi performante que possible et en un temps encore plus court que les 16 heures retenues avec la microméthode mise au point.

### **I-3- DESHYDRATATION.**

Il existe différentes méthodes de déshydratation, et celle qui a été retenue avec la microméthode : la déshydratation à l'étuve, l'a été pour des raisons de disponibilité du matériel. En effet, cette méthode a l'inconvénient de maintenir un taux d'humidité résiduelle allant de 30 à 35% ce qui est relativement élevé malgré l'utilisation de dessicateur.

L'humidité résiduelle importante était responsable d'une chute du pH d'une unité pour chaque milieu rendant la lecture difficile.

Pour s'assurer que le pH final serait celui escompté pour le milieu considéré, il était nécessaire de préparer l'inoculum à un pH supérieur (pH8)

### **I-4- COMPARAISON DES MILIEUX LIQUIDES ET DESHYDRATES.**

Les milieux liquides et les milieux déshydratés ont présenté la même spécificité de **85,2%**. Il est donc possible d'identifier les staphylocoques avec les milieux liquides ou déshydratés en ayant les mêmes possibilités de concordance mais également de discordance (**14,8%**).

Ceci rejoint la large utilisation faite des milieux lyophilisés dans les coffrets de micro-identification biochimique des staphylocoques commercialisés (3, 10, 11, 22, 27, 36)

Cependant, du point de vue des caractères, il existe plus de chance que les réactions biochimiques des milieux liquides donnent un bon résultat par rapport à celles faites avec les milieux déshydratés. Les discordances sont réduites lorsque l'identification est réalisée avec les milieux liquides.

Les discordances observées avec les caractères indispensables sont plus importantes lors de l'identification par les milieux liquides.

Le milieu à l'ONPG a présenté des discordances lors de l'étude comparative entre les milieux déshydratés et les milieux liquides . Celles-ci sont liées à des problèmes de standardisation de la méthode de recherche de la bêta-galactosidase.

Les différences observées sur les résultats des réactions d'une méthode à l'autre (24 caractères soit un taux de 5% ) ne sont pas statistiquement significatives, ce qui conforte le fait que les milieux déshydratés peuvent être utilisés en lieu et place des milieux liquides.

Ces différences peuvent être imputables aux modifications des conditions physiques subies par les milieux lors de la déshydratation.

## II- RESULTATS

### II-1-CONTROLE DE QUALITE

La reproductibilité de la microméthode mise au point est de 100% et est aussi élevée que celle des coffrets du commerce (30).

Après 3 mois de conservation à -20° C, les milieux déshydratés à 37° C ou à 42° C pendant 24 heures étaient encore stables. Cependant, la novobiocine est restée instable quel que soit le paramètre étudié. Il est donc nécessaire d'étudier la sensibilité à cet antibiotique à l'aide d'autres méthodes décrites dans la littérature (20, 31, 36) à la place de celle préconisée par la microméthode.

La novobiocine est considérée comme un test supplémentaire lors de l'identification des staphylocoques par le API Staph Ident System (11) et l'API

STAPH (30). Cependant, l'AutoMicrobic System (3) et certains auteurs(19) préconisent la recherche de la sensibilité à la novobiocine en première intention.

Le temps de réalisation de la microméthode mise au point (4 minutes et 7,14 minutes) permet une identification rapide, ce qui répond à l'exigence première des objectifs de ce travail et de toute identification des staphylocoques en général (2,4, 27, 36).

Cette méthode répond également à la nécessité d'une identification au moindre coût, sachant que le prix de revient d'un test par l'API STAPH est de 10 FF et qu'il serait de 3,95 \$ US par le Staf Sistem 18-R (36).

## II-2-ETUDE COMPARATIVE

Il est assez difficile de commenter des résultats obtenus de méthodes d'identification biochimiques qui n'étudient pas les mêmes caractères. De plus, l'étude ayant portée sur un nombre limité de souches staphylococciques, certaines données étaient difficilement exploitées. Les discordances observées lors de l'identification des souches staphylococciques entre la microméthode mise au point et l' API STAPH concernent 6 souches ; et elles concernent 3 souches entre la microméthode et la minigalerie d'identification sur un total de 41 souches de staphylocoques.

Deux souches de *S. aureus* de la microméthode productrices de DNase, et de coagulase, et utilisant le mannitol et le saccharose ont été identifiées comme des *S. hominis* par le API STAPH avec cependant un profil biochimique superposable à celui d'une souche de *S. aureus*, dont la DNase serait négative si la lecture était effectuée avec le pedigree de la microméthode.

Ces souches, qui présentaient une phosphatase alcaline négative, auraient été identifiées comme des *S. aureus* si celle-ci avait été positive et si la recherche de caractères complémentaires, en particulier la coagulase, était faite.

L'identification de la troisième souche de *S. aureus* de la microméthode par l'API STAPH a donné *S. haemolyticus*. Le profil obtenu avec le API STAPH est cette fois encore superposable à celui de *S. aureus*. La souche aurait été identifiée comme telle si la lecture était faite avec le pedigree de la microméthode. Si la phosphatase alcaline et la N-acétyl glucosamine étaient positives, ce profil aboutirait à l'identification de la souche comme étant un *S. aureus* par le registre d'interprétation du Système API STAPH, sous réserve de la coagulase positive.

Une autre souche de *S. aureus* de la microméthode a donné un *S. sciuri* par le API STAPH. Celui-ci, n'étant que très rarement isolé de produits



pathologiques d'origine humaine (15), son identification n'a pas été incorporée à la microméthode mise au point.

Cependant, l'API STAPH ne fait la différence entre *S. aureus* et *S. sciuri* qu'avec la production d'uréase, d'ADH et de coagulase. Mais sachant que *S. sciuri* n'est pas producteur de coagulase, et que cette réaction était positive avec la microméthode, il est possible de conclure qu'il s'agit d'une souche de *S. aureus* à caractères atypiques. En effet API STAPH présente des données qui montrent que 20% et 17% des *S. aureus* peuvent ne pas produire d'ADH ou d'uréase respectivement.

Ces premières discordances montrent la nécessité de procéder en première intention à la recherche de la DNase et de la coagulase et non de les rechercher en dernier recours comme il a également été souligné par certains auteurs (3).

De plus, la phosphatase alcaline est une des causes de discordances entre la microméthode mise au point et le API STAPH. Le problème de la phosphatase alcaline a également été relevé lors de l'évaluation de différentes microméthodes du commerce dont elle est partie intégrante (1).

Une souche de *S. saprophyticus* de la microméthode a présenté un profil biochimique dans lequel certains caractères ne correspondaient pas à ceux donnés par l'American society for Microbiology (25) pour *S. saprophyticus* avec : un tréhalose, un mannitol, et un lactose positifs. Par contre, si elle avait été novobiocine négative, et que le profil biochimique obtenu avec la microméthode était interprété à l'aide du pedigree de lecture, ceci aboutirait à son identification comme étant un *S. capitis*, ce qui coïnciderait avec l'identification par l'API STAPH.

Ainsi, la novobiocine, considérée comme un caractère indispensable à l'identification de *S. saprophyticus* (3,19), lorsqu'elle est source de discordance peut être responsable d'une mauvaise identification, même pour une souche dont le profil biochimique ne coïncide pas avec celui de *S. saprophyticus*.

Une souche de *S. hominis* ou *S. Warneri* a donné un profil de *S. Capitis*. avec l'API STAPH. Cette discordance est liée au fait que cette souche a présenté des discordances au niveau de certains caractères entre les deux méthodes : elle n'a pas utilisé le tréhalose et n'a sécrété ni l'ADH ni l'uréase avec l'API STAPH, contrairement aux résultats obtenus avec la microméthode. Si ces caractères avaient été concordants, l'identification aurait été la même dans les deux cas.

Ce type de discordance a été relevée notamment dans l'évaluation du Vitek System Gram positive identification cards (5) qui montre que 25 % des *S. capitis* de la méthode de Kloos et Schleifer étaient pris pour des *S. warneri* par cette microméthode commercialisée.

L'autre souche de *S. hominis* ou *S. warneri* de la microméthode pris pour un *S. haemolyticus* par la minigalerie d'identification, l'a été, du fait d'une différence dans l'interprétation des résultats. En effet :

- *S. hominis* et *S. warneri* doivent tous deux présenter une tréhalose positive quelle que soit la méthode
- l'urée doit être négative avec *S. hominis* et *S. warneri* et négative avec *S. haemolyticus* lors de l'identification par la minigalerie d'identification.

Cependant, la littérature (7, 14, 23, 24, 25) montre bien que ces réactions biochimiques doivent être comme le dit le pedigree, c'est à dire : positives.

Certaines microméthodes commercialisées ont déjà démontré leur incapacité à procéder à une bonne identification des *S. hominis* et *S. Warneri*. C'est le cas du Minitex System (10) qui identifiait certains *S. warneri* comme étant des *S. hominis* ou des *S. haemolyticus*. Ceci était lié à une discordance de différents caractères entre la méthode classique de Kloos et Schleifer et le Minitex System.

Les souches de *S. lugdunensis* de la microméthode ayant donné un profil de *S. hominis* par la minigalerie d'identification, présentent cette discordance car cette espèce est exclue du tableau d'interprétation de la minigalerie. Cependant, leur identification par la microméthode est liée à leur capacité de synthétiser l'ODC (12), couplée à l'absence de synthèse de DNase et de coagulase. Cette lacune de la minigalerie est également retrouvée dans diverses microméthodes, notamment dans le API -STAPH, le Vitek System Gram positive identification card (5, 30).

Il existe un certain nombre de discordances dans les réactions biochimiques étudiées dans la microméthode par rapport aux autres techniques étudiées.

Ces discordances pourraient être imputées à une différence

- dans le temps d'incubation de chaque méthode
- dans les concentrations en substrat,

- dans la sensibilité de l'indicateur coloré comme il a été décrit dans l'étude comparant Staph Ident System à la méthode conventionnelle de Kloos et Schleifer (27).

Cependant, avec la microméthode, ces discordances sont également liées au choix des caractères biochimiques à étudier et à la méthode d'interprétation.

La microméthode mise au point permet une bonne identification des souches staphylococciques avec un taux de **82,92 %** de **concordance** avec le API STAPH, méthode commercialisée et validée par la méthode Kloos et Schleifer (30), et avec un taux de **92,68 %** de concordance avec le schéma simplifié de Carbonnelle et Coll (32) lors de l'étude présente.

Ces taux de concordances étaient obtenus en procédant à 16 réactions biochimiques incluses dans la microméthode et à 2 réactions enzymatiques complémentaires nécessaires à une bonne interprétation : la coagulase et la DNase.

La méthode mise au point permet d'identifier les **espèces nouvelles** telles que *S. lugdunensis* décrites récemment (2) qu'il était impossible d'identifier par la microméthode d'identification et qui n'ont été incluses dans le API STAPH que très récemment malgré leur implication dans le processus infectieux.

Elle présente en outre, l'avantage de ne pas nécessiter de test complémentaire, ce qui constitue un **gain de temps** permettant de réduire le délai de culture (5). En effet, le API STAPH nécessite souvent des réactions complémentaires pour un diagnostic d'espèce (30).

Ainsi, une identification précise par la minigalerie d'identification requiert **2 à 3 jours** depuis l'isolement de la souche bactérienne jusqu'à l'identification complète (32) ; elle requiert **1 à 2 jours** si l'identification est faite par l'API STAPH System selon la nécessité ou non de procéder à la recherche de caractères complémentaires, ce qui est souvent le cas. Grâce à la batterie biochimique de la microméthode, ce délai est limité à **un jour** au bout duquel, l'espèce staphylococcique est identifiée et le résultat de la culture rendu par le laboratoire.

BALE M.J. et ses collaborateurs (4) ont déjà démontré l'avantage de l'identification des germes bactériens par une microméthode sur celle effectuée par les méthodes conventionnelles.

La microméthode permet une excellente identification des espèces staphylococciques d'origine humaine à un **prix moindre**, estimé à **114 F CFA HT** s'il est comparé à l'API STAPH qui est à **10 FF** , au Staph Ident System 18-R qui lui est à **3,9 \$ US** (30). Le principal avantage pour les laboratoires de routine réside dans le fait que la microplaque de titration et les embouts peuvent être récupérés et réutilisés après lavage, séchage et stérilisation au four à micro-ondes.

Les limites de cette microméthode mise au point résident d'abord dans les conditions de **déshydratation**. En effet, le rendement de la microméthode

pourrait être amélioré avec la suppression du problème de la chute du pH lors de la déshydratation et de la conservation si le taux d'humidité résiduelle pouvait être ramené à **4% (6)** par des méthodes de déshydratation notamment en flux continu.

L'identification différentielle entre *S. hominis* et *S. warneri* était impossible avec la microméthode telle qu'elle a été conçue, car la  $\beta$ -glucuronidase, caractère indispensable à leur différenciation n'a pas été retenue (**24,25**). Ceci constituait un inconvénient certain de la microméthode, problème qui était cependant retrouvé avec d'autres microméthodes (**5**).

Les limites de la microméthode concernent également le **pedigree** d'interprétation qui ne prenait pas en compte les souches staphylococciques ayant un profil atypique. Les discordances qui en découlent pourraient rendre la méthode moins performante par rapport aux méthodes qui convertissent le profil biochimique obtenu en un numéro code (**1, 18, 22, 36**).

Pour lever les limites à l'identification des staphylocoques, certaines modifications devront être apportées dans le cadre d'études ultérieures :

- L'humidité résiduelle devra être réduite au minimum, par une modification de la méthode de déshydratation, en utilisant par exemple la technique de déshydratation par un flux d'air continu.

- L'addition de la recherche de la  $\beta$ -glucuronidase parmi les caractères d'identification biochimique permettrait de faire la différence entre les souches de *S. hominis* et les souches de *S. warneri* qui sont respectivement positives et négatives (**24, 25**).

- La novobiocine étant instable lors de la conservation avec la formule donnée dans la microméthode, elle devra être l'objet de recherches ultérieures de façon à l'incorporer à la microméthode sans nécessiter une préparation extemporanée.

Ainsi son intégration sous forme de disque (**19,36**) à introduire dans un puits de la microplaque a été décrite et il existe des méthodes rapides de recherche de la résistance à la novobiocine dans le commerce(**20**).

- L'informatisation de la méthode d'interprétation permettrait de combler les lacunes de la méthode d'interprétation (**29**).

- L'existence de pseudocoagulase produite par certaines souches de staphylocoques (**33, 37**) pourrait être responsable d'une coagulase faussement

positive, et donc, de l'identification de ces souches comme *S. aureus* ; le fait d'ajouter des anticoagulants et des inhibiteurs de la protéase produits, tel que l'EDTA, l'aprotine, le N-éthylmaleimide et l'héparine au plasma de lapin permettrait d'inhiber la synthèse de cette pseudocoagulase.

- L'augmentation de la densité de l'inoculum permettrait de renforcer la performance de la microméthode concernant la réduction du temps d'incubation et donc du délai de lecture tout en maintenant la spécificité à un taux élevé.

## RESUME

Les staphylocoques à l'occurrence, les staphylocoques coagulase négative (SCN) sont des commensaux ubiquitaires de la peau et des muqueuses. Lors de leur isolement, ils sont souvent considérés comme des contaminants ou comme des germes non pathogènes car non impliqués dans le processus infectieux.

Cependant, différentes études ont prouvé leur responsabilité dans des infections sévères locales et systémiques chez des patients immunodéprimés ou non. Malgré ce rôle pathogène devenu évident, la bonne identification des SCN n'était pas souvent possible en routine dans les laboratoires. En effet, la mise au point et la simplification du schéma d'identification biochimique des staphylocoques de Kloos et Schleifer n'a pu résoudre le problème puisque cette méthode présentait l'inconvénient de nécessiter le recours à un grand nombre de réactions biochimiques, à des milieux hautement spécialisés et à des temps d'incubation souvent trop longs. Ces inconvénients ont eu pour effet de limiter son utilisation comme méthode de référence des laboratoires de recherche lors des études portant sur l'identification biochimique des staphylocoques.

Récemment, face à l'augmentation du nombre des staphylocoques cliniquement significatifs dans les isollements de produits pathologiques d'origine humaine, la nécessité d'une identification précise et rapide s'est fait de plus en plus vive. c'est alors que des méthodes d'identification biochimique rapides permettant un diagnostic précis ont émergé sur le marché, mais elle présentaient l'inconvénient de nécessiter un support financier important, ce qui limitait leur utilisation en routine dans les pays en développement.

Le but de ce travail n'était pas de mener une étude épidémiologique sur la distribution des espèces staphylococciques selon la nature du produit pathologique ou selon la clinique. Ce n'était pas non plus la comparaison d'une méthode mise au point avec une méthode de référence.

Le but de ce travail était d'une part, la mise au point d'une technique utilisant le moins de réactifs possibles qui permettent l'identification biochimique des staphylocoques ; technique qui devra répondre aux exigences scientifiques et économiques des laboratoires de routine. D'autre part, ce travail avait pour but d'évaluer la méthode qui aura été mise au point en comparaison avec des méthodes reconnues qui sont, l'API STAPH et la minigalerie d'identification biochimique des staphylocoques. Ces deux dernières ne sont pas des méthodes de référence, mais étant utilisées en pratique courante, elles permettent de valider la microméthode mise au point.

La microméthode mise au point permet l'identification biochimique des staphylocoques et repose sur 16 réactions qui consistent à la recherche de l'assimilation de 9 hydrates de carbone (glucose, tréhalose, mannitol, xylose, saccharose, glycérol, mannose, lactose, raffinose) ; de 5 enzymes (uréase, arginine-dihydrolase, ornithine-décarboxylase, bêta-glucosidase, nitrate réductase) ; d'un composé résiduel (acétyl-méthyl-carbinol) ; et de la sensibilité à un antibiotique : la novobiocine.

Elle nécessite une incubation d'au moins **16 heures** à **37° C** à l'étuve et peut être réalisée en milieu liquide ou déshydraté avec le même taux de spécificité qui est de **85,2%**. Elle a présenté une reproductibilité de **100%** et une meilleure stabilité des milieux déshydratés lorsque la dessiccation était réalisée à **37° C** à l'étuve pendant **24 heures** et lorsque la conservation se faisait à **-20° C** quel que soit le conditionnement : emballage en plastique ou en téflon.

Elle a témoigné d'une facilité de la mise en oeuvre qui rend la manipulation rapide : en **4 minutes** avec les milieux déshydratés et en **7 minutes** avec les milieux liquides.

Sur un total de **41** souches staphylococciques provenant de divers produits pathologiques, l'identification par la microméthode a abouti à une concordance pour **33** d'entre elles, avec le API STAPH et pour **38** d'entre elles, avec la minigalerie d'identification ; ce qui ramène à des taux de **82,97%** et **92,68%** de concordance, respectivement.

La méthode ainsi mise au point présente plusieurs avantages :

- elle permet une identification précise d'un grand nombre de souches de staphylocoque
- elle présente un grand intérêt diagnostique car, par cette méthode, il est aujourd'hui envisageable de procéder à une étude épidémiologique pour connaître la prévalence des différentes espèces de staphylocoques du Sénégal en fonction de la localisation humaine et de la pathologie dont elles seraient éventuellement responsables
- en pratique, cette microméthode permet une identification rapide avec une haute spécificité, une facilité et une rapidité de mise en oeuvre qui font d'elle une excellente méthode pour l'identification des staphylocoques par les laboratoires d'analyses médicales dans les pays en développement
- la microméthode permet enfin une identification au moindre coût, évalué à **114 F CFA HT** d'où la possibilité de son inclusion dans le cadre d'études épidémiologiques à grande échelle jusqu'ici difficilement réalisables avec les coffrets commercialisés.



Dans le but d'une utilisation plus large de la microméthode, certaines modifications devront être apportées notamment dans le choix

- des réactions biochimiques
- de la densité de l'inoculum
- des méthodes de déshydratation
- dans l'interprétation qui pourrait être informatisée.

Toutes ces modifications qui seront apportées dans le cadre d'études ultérieures permettront de rendre la microméthode plus performante et encore plus économique.