

## INTRODUCTION

Les Staphylocoques occupent en pathologie une place importante par leur nombre et la gravité des infections qu'ils provoquent. **(4, 18, 41, 42)**.

Les caractères métaboliques au sein d'un même groupe ont permis d'individualiser quelques 39 espèces et sous-espèces **(41)** qui présentent des adaptations variables selon le biotype pouvant être l'espèce de l'hôte ou l'habitat chez un même hôte.

Chez l'homme, les infections à Staphylocoques peuvent être localisées et de propagation directe en atteignant essentiellement le revêtement cutané.

Elles peuvent aussi diffuser par voie sanguine en prenant un caractère septicémique et un polymorphisme symptomatique extrême.

L'existence de souches multirésistantes et l'apparition de nouvelles résistances peuvent poser de sérieux problèmes pour le choix du traitement de ces infections.

Les Streptocoques et les Entérocoques continuent de jouer un rôle important dans la pathologie infectieuse humaine. La plupart des streptocoques sont des commensaux habituels des cavités naturelles ou téguments **(46)**. Mais cette flore commensale peut devenir pathogène et être responsable d'infections streptococciques.

Ces infections restent parmi les plus fréquentes et les plus sévères des maladies bactériennes.

De plus, la résistance aux antibiotiques est un phénomène en évolution chez ces espèces.

Les Entérocoques sont présents un peu partout dans l'organisme et principalement au niveau du tractus intestinal. *E. faecalis* et *E. faecium* sont

responsables de la quasi-totalité des infections chez l'homme **(33, 35, 44, 51, 67, 68, 70)**.

L'augmentation croissante de leur isolement au cours d'infection diverse **(35, 37, 51, 67)**, l'importance de la place qu'ils occupent en pathologie nosocomiale **(19, 33, 35, 44, 67, 68, 69,70)** , l'émergence et l'accumulation des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ils occupent la troisième place derrière *S. aureus* et *E. coli* **(35, 72)** dans les infections nosocomiales.

L'objectif fixé est la mise au point et l'évaluation d'une microméthode qui puisse concourir à l'identification et à l'étude de la sensibilité des Staphylocoques, Entérocoques et Streptocoques isolés des produits pathologiques.

Cela rendra le travail de routine plus rapide, plus fiable et plus accessible financièrement aux populations même les plus démunies.

# PREMIERE PARTIE : GENERALITES

## A./ LES STAPHYLOCOQUES

### I / Taxonomie

#### 1. Historique.

Les Staphylocoques ont été identifiés dès l'aube de l'ère pasteurienne 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 Gram positif. Ces cocci seront ensuite isolés puis identifiés d'un pus par Louis Pasteur en 1880. Ils seront baptisés en 1883 par Ogston sous le nom de staphylocoques, du latin « staphylle » ou grappe et coccus ou « grain ».

En 1884, ils sont classés en fonction de la pigmentation des colonies par Rosenbach en *S. aureus* du latin « orange » et *S. albus*, du latin « blanche ».

#### 2. Classification (27, 46, 61) .

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococaceae* qui dans l'édition du Bergey's Manual de 1986 comprend trois autres genres : *Micrococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus*.

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* (31, 41). Ces espèces et sous espèces constituent l'essentiel de la flore résidente de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Elles peuvent être classées en fonction de l'hôte (14).

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont classées en deux groupes selon qu'elles produisent ou non une coagulase libre active sur le plasma oxalaté de lapin :

- ✓ Les staphylocoques à coagulase positive : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyiucus*. On note pour l'espèce *S. aureus* la production d'un pigment caroténoïde jaune doré, d'où la dénomination de staphylocoque doré et la présence dans la paroi d'une protéine A antigénique.

- ✓ Les Staphylocoques à coagulase négative. On distingue quelques espèces d'origine humaine différenciables par leur biotype et sérotype : *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans*.

Cependant les nouvelles méthodes tendent à démembrer la famille des *Micrococaceae* dont l'homogénéité phylogénique est aujourd'hui contestée. Il existe actuellement des méthodes taxonomiques modernes basées sur l'étude de la structure de la paroi d'une part et d'autre part des méthodes génétiques. (14, 32).

## II - Caractères bactériologiques

### II-1- Caractères 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 **(31)**. Le mode de groupement dit en "grappe" ou en "amas" est plus caractéristique après culture sur un milieu gélosé **(31, 53)**. 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 **(15)**.

Sur le plan individuel, ce sont des cocci mesurant 0,7 à 1,2 $\mu$ m **(31, 53)**, immobiles asporulés, généralement acapsulés ou ayant une faible capacité de synthèse de capsule **(31, 42)**.

### II-2- Caractères cultureux

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* **(31, 42, 53)** 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 **(42, 53)**.

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 **(31, 53)**.

En bouillon ordinaire, la culture est rapide et les staphylocoques se multiplient en quelques heures, formant un trouble homogène ou un dépôt **(31)**.

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 non diffusible en 24 heures à 37°C, pigment qui sera plus prononcé après 24 à 48 heures de plus à la température ambiante **(31, 53)**.

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 **(53)**.

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 **(31, 53)**.

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 mn 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 **(31)**.

### **II-3 Caractères biochimiques et métaboliques 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 **(41)**.

#### **II-3-1-Caractères généraux**

Les staphylocoques possèdent une catalase à l'exception de *S. aureus* sous espèce *anaérobicus* que l'on retrouve exclusivement chez les moutons

(41, 43) et qui est une souche anaérobie stricte. Ce sont des germes dépourvus d'oxydase en dehors de *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. caseolyticus* (31, 41).

### **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) (49).

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.

### **II-3-3- Acidification du glycérol en présence d'Erythromycine (15)**

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-3-4- Test au composé vibriostatique 0/129 (15)**

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-3-5- Activité phosphatasique (42)**

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

### **II-3-6- Production de décarboxylases (42)**

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 :

Les enzymes recherchées le plus souvent sont :

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

### **II-3-7- Production d'Uréase (42)**

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, entraînent le virage du rouge de phénol du jaune au rouge cerise.

### **II-3-8- Production de la bêta-galactosidase (42)**

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 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.

### **II-3-9- 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.

### **II-3-10- Résistance à la Novobiocine**

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antibiotique est supérieure ou égale à 1,6µg /ml.

Les Staphylocoques coagulase négative sont habituellement classés selon le critère de sensibilité ou de résistance à la novobiocine. **(49)**.

La novobiocine est un antibiotique bactériostatique 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 relâchement du sur-enroulement et le clivage de l'ADN **(49)**.

### **II-3-11- 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 **(42)**.

### **II-3-12- Réduction des Nitrates**

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 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 élaborées**

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 **(31)**.

Ces protéines sont synthétisées pendant la phase exponentielle de croissance ou au début de la phase stationnaire **(42)**.

### **III-1- Toxines staphylococciques**

#### **III-1-1- Les hémolysines**

Quatre hémolysines différentes ont été identifiées et elles produisent toutes une béta 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 **(42)**.

#### **☞ 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 (31, 42).

### ☞ **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) (12, 14).

### ☞ **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 (31, 42).

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 (31, 42).

### ☞ **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 **(31, 42)**.

### **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 **(31, 42)**.

### **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 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

### **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**(31)**

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

Elle intervient également dans la pathogénicité des Staphylocoques (31).

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.

### **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.

### **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. **(31)**.

### **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 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 pathogénicité des staphylocoques en favorisant sa diffusion dans le tissu conjonctif **(31)**.

## **IV- Caractères antigéniques.**

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 antigènes pariétaux.**

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

Constitué d'un enchaînement linéaire de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique. 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 (**31, 34, 53**).

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

Ce sont des polymères linéaires de ribitol ou de glycérol, unis par des liaisons phosphodiesters 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.

Leur activité biologique est peu connue, mais ils sont immunogènes (**31, 53**).

#### **IV-2- Les antigènes pariétaux 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 (**31**).

#### **IV-3- Les antigènes de surface ou antigènes 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 **(30, 31, 34 , 53)**.

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 - Caractères génétiques**

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 **(53)**

### **V-1- Le chromosome staphylococcique.**

De conformation circulaire, il est constitué de groupes de liaisons **(15, 29)** dans lesquels sont individualisés des gènes qui codent pour différents caractères : la virulence, les récepteurs bactériophagiques, la production de pigment, l'antibiorésistance **(31, 53)**

### **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 **(53)**.

### **V-3- Les transposons.**

Ce 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 qui les possèdent un caractère lysogénique permettant la caractérisation épidémiologique des souches **(31)**

Ils portent des gènes qui participent aux échanges génétiques et qui codent la synthèse de la staphylokinase et de l'entérotoxine A entre autres **(31, 53)**.

### **V-5- Les échanges génétiques.**

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

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

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 **(31)**.

## **B / STREPTOCOQUES ET ENTEROCOQUES**

### **1. Historique (28)**

Le nom *Streptococcus* (streptus : flexible ; coccus : grain) fut pour la première fois attribué par BIRLOTH et EHRLICH à des coques formant des chaînettes observées dans les prélèvements provenant de blessures infectées.

PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (1881) rendirent compte d'une infection septicémique obtenue chez les lapins inoculés avec de la salive humaine.

FAHLEISEN (1883) décrivit un coque similaire comme agent de l'érysipèle. Le nom de *Streptococcus pyogenes* fut donné par ROSENBAACH (1884) à des coques groupés en chaînettes et isolés de lésions suppuratives chez l'homme.

NOCARD et MOLLEREAU (1887) découvrirent le "*Streptococcus* de la mammite de Nocard" qui ensuite fut appelé *Streptococcus agalactiae*.

LANCEFIELD, en 1933 décrivit les groupes sérologiques de A à F.

Les souches de référence de streptocoques du groupe B étaient d'origine bovine. Les infections néonatales dues à ce groupe ont été plus récemment signalées en 1962 par REITEL et collaborateurs et par WAHL et collaborateurs en 1964 par EICKHOFF et coll **(23)**.

SCHULTZ décrivit les streptocoques isolés de lésions de pneumonie et de gourme chez les chevaux.

SCHLEIFER réalisa la séparation des deux genres *Streptococcus* et *Enterococcus* en 1984. Les infections à streptocoques qui autrefois étaient considérées comme propres aux pays froids et humides sont maintenant fréquentes en zone tropicale particulièrement en Afrique de l'Ouest **(5)**.

Pour ce qui est du Sénégal, les premiers travaux ont été décrits avec les infections à streptocoques hémolytiques du groupe A **(64)**.

D'autres suivirent et permirent de démontrer que ces affections occupaient la deuxième place des statistiques cardiologiques de villes africaines **(64)**.

## 2. Taxonomie (46, 65)

Depuis leur découverte, beaucoup de critères ont servi pour la classification des streptocoques :

- ◆ critères morphologiques
- ◆ origine des souches
- ◆ action sur les sucres
- ◆ action sur les globules rouges
- ◆ structure antigénique
- ◆ caractères biochimiques
- ◆ culture en milieux hostiles

Selon Le Minor (46) étant donné que les streptocoques peuvent être responsables d'infections réalisant des aspects cliniques différents, ils ne seront pas classés sur des critères cliniques ou de pathogénéicité mais sur des critères bactériologiques ayant comme base :

- ◆ la capacité d'hémolyser les érythrocytes
- ◆ la présence d'antigènes polysaccharidiques spécifique de groupe dans leur paroi cellulaire
- ◆ les réactions biochimiques spécifiques.

Une nouvelle classification répartit désormais cette famille en 15 genres parmi lesquels, les streptocoques, abiotrophes et entérocoques sont le plus souvent concernés en pathologie humaine. Le système de classification actuel se réfère à la fois aux données précédentes et à l'analyse des acides nucléiques

(taxonomie moléculaire). Ces techniques ont permis de faire progresser considérablement la classification de cette famille, qui s'enrichit actuellement de nouveaux genres, ensembles, sous-ensembles, espèces et sous-espèces **(65)**.

### **3. Habitat**

Les streptocoques appartenant à la famille des *streptococcaceae* sont retrouvés à l'état commensal sur la peau et les muqueuses **(73)**. Ce sont des germes ubiquitaires.

Les Streptocoques du groupe D sont retrouvés dans l'intestin et ceux du groupe B dans les voies génitales. Dans la bouche on a les streptocoques non groupables appelés *salivarius*, *sanguis*, *mitis*, *mutans* ; qui donnent des dextrans jouant un rôle dans les caries dentaires.

### **4. Caractères morphologiques (46, 73)**

Ils se présentent sous forme de coques ovoïdes ou sphériques à Gram positif et groupés en chaînette. Les chaînettes résultent de la non séparation des paires de coques en division et se présentent comme une succession de diplocoques.

Par contre, la formation de chaînettes est de rigueur dans les milieux artificiels et dans les exsudats purulents des lésions ouvertes.

Les Streptocoques des groupes A, C, G caractérisés par de longues chaînettes donnent sur milieux liquides une culture en dépôt.

Les autres donnent un trouble homogène du bouillon et se présentent alors sous la forme de diplocoques (*S. pneumoniae*) ou de courtes chaînes (streptocoques du groupe B, *S. bovis*).

Le phénomène de capsulation peut être observé avec les streptocoques du groupe A et surtout du groupe C dans la phase exponentielle de croissance.

Dans les cultures âgées les coques deviennent Gram négatif.

Les streptocoques déficients présentent des anomalies morphologiques constantes lors de l'isolement.

D'une manière générale, les streptocoques du groupe A sont constitués de cellules bien arrondies. Ceux du groupe D ont une forme de ballon de rugby. *Streptococcus pneumoniae* possède un aspect en flamme de bougie.

## **5. Caractères cultureux (7, 8, 46)**

Les streptocoques peuvent pousser sur des milieux usuels mais néanmoins, ils ont des exigences nutritives très complexes.

Tous les streptocoques sont aéro-anaérobies. Ce sont des germes très fragiles.

La température idéale de croissance est comprise entre 20 et 42°C avec un optimum à 35-37°C.

### **5.1. Culture sur milieux usuels**

La plupart des streptocoques poussent sur ces milieux et réalisent sur gélose nutritive des colonies très fines transparentes dispersées à la surface en grain de semoule avec une couleur légèrement bleutée.

Cette culture étant difficile, il est préférable de la réaliser sur milieux enrichis.

## **5.2. Culture sur milieux enrichis**

Certaines substances sont habituellement utilisées pour enrichir les milieux. Ce sont les peptones, les extraits de viande ou infusion de cœur-cervelle, le sang, le sérum et / ou l'ascite.

Les milieux peuvent se présenter soit sous forme liquide, soit sous forme solide.

### ***5.2.1. Milieux liquides d'enrichissement (46)***

Les Streptocoques supportent très mal les milieux glucosés. En effet le glucose par voie fermentative donne de l'acide lactique avec un abaissement du pH qui rend le milieu hostile. C'est la raison pour laquelle on utilise le bouillon glucosé tamponné (B.G.T.).

On peut également utiliser le bouillon streptosel . Les Streptocoques donnent soit un trouble homogène avec ou sans dépôt (groupe B,D), soit une pousse granulaire avec sédimentation rapide, le surnageant pouvant être limpide ou légèrement trouble (A,C,G).

### **5.2.2. Milieux solides d'isolement (7, 46)**

Les milieux les plus généralement utilisés sont les géloses enrichies au sang (sang de mouton ou de cheval) . Ces milieux permettent de voir la capacité des streptocoques à lyser les hématies.

On peut observer une pousse des streptocoques 24 heures après incubation à l'étuve sous une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

L'aspect de la zone d'hémolyse et sa dimension sont fonction de l'hémolysine élaborée par la souche, du sang utilisé mais également du milieu.

Sur ces milieux enrichis, on distingue différents types d'hémolyse.

### ➤ **Hémolyse bêta**

C'est une hémolyse complète. Les hématies sont complètement lysées sur un diamètre d'environ 3 à 4 mm autour des colonies.

Cette hémolyse s'observe en général avec les streptocoques des groupe A, C, G double et quelque fois quadruple celle de la zone en question.

Les streptocoques du groupe B quant à eux présentent une zone d'hémolyse très petite et par conséquent pas claire.

### ➤ **Hémolyse alpha**

Elle est incomplète. Les globules rouges ne sont que partiellement lysés sur un diamètre d'environ 1 à 2 mm. Cette hémolyse peut quelque fois être accompagnée d'un verdissement du milieu.

On parle alors d'une hémolyse alpha viridans. Le mécanisme de cette coloration est mal connu.

### ➤ **Hémolyse gamma ou absence d'hémolyse**

Il n'existe aucune trace d'hémolyse. On utilise plus couramment le terme streptocoque non hémolytique. *S. salivarius* et *S. milleri* présentent une telle hémolyse.

## **6. Caractère biochimique (73)**

### **6.1. Absence de catalase**

Elle permet d'établir un diagnostic différentiel entre *Streptococcus* d'une part et *Staphylococcus* et *Micrococcus* d'autre part. L'absence de catalase constitue alors un caractère clef d'orientation vers les streptocoques.

### **6.2. Sensibilité à l'optochine**

Les streptocoques résistent à l'optochine sauf les pneumocoques. Les streptocoques à l'exception des pneumocoques poussent jusqu'au contact des disques.

### **6.3. Hydrolyse de l'esculine**

L'esculine est un glucoside dérivé de la coumarine (dioxycoumarine et glucose). Les streptocoques du groupe D hydrolysent l'esculine en aglicone qui en présence de sels de fer donne une coloration noire.

## **7. Constitution antigénique (73)**

Les cellules des streptocoques sont composées de substances antigénique localisées dans la paroi. La constitution antigénique des streptocoques est complexe et on retrouve de la périphérie à l'intérieur :

### **7.1. La capsule**

Sa composition chimique est variable selon l'espèce.

### **7.2. La paroi cellulaire**

Elle conditionne la forme et rigidité de la paroi de la bactérie. Elle porte également les facteurs les plus importants de l'interaction hôte parasite. Elle est composée de trois couches successives :

- ◆ protéines (M, R, T)
- ◆ polyoside C
- ◆ mucopeptide (Peptidoglycane)

### **7.3. Le polyoside C**

Il est enchâssé dans la muréine. On l'appelle aussi antigène C. Il est spécifique de groupe et se situe entre la couche protéinique et le peptidoglycane. Les polyosides C, non toxigène, sont des haptènes et ne deviennent antigéniques que lorsqu'ils sont attachés au peptidoglycane par des liaisons covalentes.

### **7.4. Le peptidoglycane**

Responsable de la rigidité de la paroi streptococcique, le mucopeptide représente la structure de base de la paroi cellulaire.

Le peptidoglycane possède plusieurs propriétés biologiques. Il est antigénique immunologique, pyrogène .

### **7.5. L'acide teichoïque**

Composé d'un polyglycérophosphate, l'acide teichoïque a pour rôle primordial de lier les cations bivalents.

Associé à un composant lipidique, il prend le nom d'acide lipoteichoïque (LTA) qui serait responsable de l'adhérence des streptocoques aux différentes muqueuses et cellules épithéliales.

### **7.6. La membrane cytoplasmique**

Elle est composée de 72 % de protéines, 25% de lipides et de 2% de polysides.

### **7.7. Le cytoplasme**

Il est composé d'enzymes, et d'une fraction nucléoprotéinique dont celle des streptocoques du groupe A (py1) qui hétérogène antigéniquement, donnerait des réactions croisées avec les staphylocoques , les pneumocoques et les streptocoques non hémolytiques.

## 8. Pouvoir pathogène (46, 48)

### 8.1. Pouvoir pathogène naturel

Les infections dues aux streptocoques en général occupent une place très importante dans les infections nosocomiales.

Les Streptocoques du groupe A sont principalement isolées des lésions suppuratives (ayant des germes vivants) et non suppuratives post-streptocociques telles que le rhumatisme articulaire aigu (R.A.A.), la glomérulonéphrite aiguë, la chorée, l'érythème noueux. Ils sont responsables des endocardites aiguës et de certaines infections cutanées dont l'érysipèle. Les streptocoques du groupe A sont également incriminés dans les toxi-infections alimentaires dont la clinique se présente sous forme d'angines aiguës.

Les infections provoquées par les streptocoques du groupe C sont d'une extrême gravité mais sont plus rarement rencontrées que celles dues aux streptocoques du groupe A et G.

Les Streptocoques du groupe C peuvent coloniser l'organisme et les infections les plus couramment rencontrées sont les angines, les méningites, les septicémies et les pneumonies surtout chez les immunodéprimés. L'incidence des bactériémies de streptocoques du groupe C est faible. Quant aux streptocoques du groupe G, ils font partie intégrante de la flore vaginale, pharyngienne, cutanée et intestinale.

Les Streptocoques du groupe D sont responsables d'infections urinaires, de septicémies, d'infections hépatobiliaires et même d'intoxication alimentaire. Ceux du groupe B sont impliqués dans les méningites néonatales septicémies et les avortements **(20)**.

Les Streptocoques non groupables sont à l'origine d'endocardites **(38)** alors que le pneumocoque est responsable d'affections régionales (otites, méningites) pulmonaires (pneumonie franche lobaire aiguë) et métastatiques (endocardites, péricardite etc.)

## **8.2. Pouvoir pathogène expérimental**

Pour tester la virulence des souches de *Streptococcus pyogenes*, l'animal de choix utilisé est la souris blanche. Le passage répété de la souche chez cet animal augmente la virulence.

## **9. DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE (46)**

Le diagnostic étiologique des maladies dues aux streptocoques est très difficile à établir. Ces germes peuvent être isolés de certains produits pathologiques alors qu'ils ne sont pas les réels agents microbiens responsables de la maladie. Des précautions s'imposent alors lors des prélèvements.

Ces derniers serontensemencés dans des milieux nutritifs gélosés comme la G.S.O. (gélose au sang ordinaire).

Pour les produits pathologiques polymicrobiens, on peut procéder de deux manières :

- Ensemencement direct dans de la gélose au sang à laquelle on a additionné des agents inhibiteurs de la flore associée (Milieu sélectif).

- Ensemencement dans liquide d'enrichissement puis isolement à partir de la gélose au sang.

Les incubations se feront sous atmosphère enrichie d'au moins 5% de CO<sub>2</sub>.

L'absence de catalase est un test qui nous permet de nous situer dans le genre *Streptococcus*.

La détermination de l'hémolyse permet d'avoir une idée des groupes de Streptocoques qui pourraient être rencontrés. Elle oriente aussi le diagnostic sérologique.

En effet, dans les prélèvements du rhinopharynx, seuls les Streptocoques A, C et G sont témoins d'une pathologie. La majeure partie des streptocoques bêta-hémolytiques sont groupables et l'extraction de l'antigène peut se faire de différentes manières :

- ◆ Méthode de Lancefield en milieu acide chauffé à 100°C.
- ◆ Méthode de Fuller avec la formamide à 160°C.
- ◆ Méthode d'extraction enzymatique à la pronase B.

L'agglutination sur lame ou bien au latex sont des méthodes rapides de groupage applicables aux streptocoques des groupes A, B, C, F et G.

Il existe des tests biochimiques permettant de différencier les espèces à l'intérieur des Streptocoques du groupe C.

## **10. Diagnostic sérologique (66)**

Il est immunologique et peut s'effectuer à tous les stades de l'infection. Il consiste à déterminer le taux sérique des anticorps neutralisants correspondant aux exoprotéines streptococciques.

La détermination du taux d'antistreptolysine O (ASLO) et de l'antidésoxyribonucléase B est pratiquée en routine (ADNase B).

Les ASLO augmentent à la première semaine de l'infection primaire atteignent un maximum entre la 3<sup>e</sup> et la 5<sup>e</sup> semaine. Le taux se normalise aux environs de un an après avoir commencé à baisser au 2<sup>e</sup> mois. La valeur normale des ASLO est de 200 U.I.

Quant à l'ADNase B, son augmentation ne commence qu'à partir de la 2<sup>e</sup> semaine. Le maximum est atteint entre la 4<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> semaine et reste élevé pendant longtemps. La valeur normale est supérieure à 100 U.I. Il est à signaler que ces valeurs sont fonction de l'individu, de son âge, de la zone où il se trouve mais aussi de la technique mise en œuvre.

## **C / SENSIBILITE ET RESISTANCE**

### **1- Notion de résistance (13)**

- Une souche est dite "résistante lorsqu'elle supporte une concentration d'antibiotique, notamment plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce

- Une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est notamment plus élevée que la concentration pouvant être atteinte in vivo

En d'autres termes, cette résistance peut être naturelle ou acquise. **(47, 56, 63)**

#### **1.1 La résistance naturelle**

La résistance naturelle un caractère chromosomique présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce .

La résistance naturelle serait alors sous la dépendance d'un gène. Le DNA de la bactérie résistante ne code pas un des éléments intervenant dans le mécanisme de l'action, au niveau de la paroi ou du cytoplasme.

## 1.2. La résistance acquise

Elle résulte soit :

- d'une mutation chromosomique .
- de l'acquisition d'un gène qui rend la bactérie insensible à l'antibiotique ; on parle de résistance plasmidique .
- d'une mutation chromosomique .
- de l'acquisition d'un gène qui rend la bactérie insensible à l'antibiotique ; on parle de résistance plasmidique .

## 2. NOTION DE SENSIBILITE

### 2.1 DEFINITION

Une bactérie est dite "sensible" à un antibiotique si elle fait partie de son spectre d'activité c'est à dire l'éventail d'espèces bactériennes susceptibles d'être inhibées par des concentrations de cet antibiotique (surtout in vivo après utilisation d'une posologie standard) .

### 2.2 E-Test® (epsilon-meter – test) (11)

Le E-Test® est une technique de détermination de la CMI fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester couvrant une zone continue de 0,016 à 256 mg/l ou 0,002 à 32 mg/l en fonction des molécules.

Les bandelettes sont des supports inertes, hydrophobes de 5mm de large et de 80mm de long. Elles sont appliquées sur la surface d'une gélose préalablement ensemencée avec la souche à étudier.

Après incubation, l'inhibition de la croissance bactérienne se traduit par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelette définit la CMI.

Une échelle de lecture imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une lecture rapide.

## DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

### I / IDENTIFICATION DES STAPHYLOCOQUES, ENTEROCOQUES ET STREPTOCOQUES

#### 1- Préparation des milieux

##### a) Matériel

Agitateur magnétique

Balance de précision

pH mètre

Seringues

Filtre de 0,2 $\mu$ m de diamètre

Micropipettes

Embouts stériles

Flacons de verre avec bouchon à vis 50- 100- 150ml

Tubes stériles 2,5- 5ml

Erlen Meyer

Papier d'emballage

##### b) Réactifs

- Glucides: glucose, mannitol, lactose, sorbitol, saccharose
- Bleu de bromothymol, peptone bactériologique, peptone tryptique, rouge phénol
- Chlorure de sodium
- Soude
- Bouillon nutritif

- L tryptophane, L lysine, L.arginine, L ornithine, L phényl alanine
- Phosphate monopotassique, dipotassique
- Citrate trisodique, malonate de Na
- Urée
- Alcool 95°
- Extrait de levure
- Sulfate d'ammonium
- Sulfate de Mg
- Phosphate d'ammonium
- Thiosulfate de Na
- Sous acétate de Pb
- Nitrate de potassium
- Poudre d'ONPG, tampon phosphate

- **Réactifs de révélation**

- Soude à 40% (ou KOH à 10%) VP1                NaOH    40g  
(ou KOH 10g)  
Eau distillée 100ml

- Créatinine à 1% VP2  
Créatinine                1g  
Eau distillée            100ml

- Alpha naphtol VP3  
Naphtol 1                6g

Ethanol 100ml

- Acide sulfanilique à 8g/l GRIESS

Acide sulfanilique 0,8g

Ethanol 100ml

- Apha-naphtylamine à 5g/ GRIESS II

$\alpha$  naphtylamine 0,5g

Ethanol 100ml

- Perchlorure de Fer au 1/3

Perchlorure de Fer officinal 10ml

Eau distillée 20ml

- Réactifs de Kovacs

p-diméthylamino-benzaldéhyde 5g

Alcool amylique 75ml

HCl pur 25ml

NB: dissoudre l'aldéhyde dans de l'alcool au bain-marie à 60°C.

Refroidir et ajouter l'acide goutte à goutte en maintenant le récipient dans la glace.

Conserver à 4°C en flacon ombré.

- Ninhydrine à 7g/l

Ninhydrine 0,7g

2-méthoxy-éthanol 100ml

### c) Préparation

#### → sucres

**Tableau I : Préparation des sucres**

Glucides		Stérilisation	Température et durée	
Lactose	10%	Tyndalisation ou	110°C	30min × 3j
Glucose	10%	filtration	110°C	10min
Mannitol	10%	Autoclavage	110°C	10min
Saccharose	10%	Autoclavage	100°C	30min × 3j
Sorbitol	10%	Tyndalisation ou	110°C	10min
Rhamnose	10%	filtration	110°C	10min
Adonitol	5%	Autoclavage	110°C	10min
Dulcitol	2%	Autoclavage	110°C	10min
Inositol	5%	Autoclavage	110°C	10min
		Autoclavage		
		Autoclavage		

#### → MEVAG STAPHYLOCOQUES

Phosphate d'ammonium		0,1g
Chlorure de potassium		0,02g
Sulfate de magnésium		0,02g
Extrait de levure		0,1g
Rouge de phénol		0,015g
Eau distillée	qsp	100ml

Autoclaver à 115°C pendant 15 mn et ajuster le pH à 6,9 - 7,3

→ **MEVAG STREPTOCOQUES ET ENTEROCOQUES**

Chlorhydrate de cystéine	0,1g
Tryptone	2g
NaCl	0,2g
Sulfate de sodium	0,05g
Rouge de phénol	0,017g (1,7ml de solution à 1%)
Eau distillée	qsp 100ml

Ajuster à pH 7,8

Autoclaver à 115°C pendant 15 mn.

→ **Milieux de recherche des décarboxylases**

- Formule : extrait de levure 0,6g
- Glucose 0,2g
- NaCl 1g
- Rouge phénol 0,03g
- Acide aminé (L arginine, L lysine, L ornithine) 1g
- Eau distillée 100ml

Ajuster le pH à 6,3 - 6,4 et autoclaver à 120°C pendant 15min.

NB : ajouter l'acide aminé à 4% quand c'est sous la forme DL.

→ **Milieu pour recherche de l'uréase**

- Formule : L tryptophane 0,6g
- Phosphate monopotassique 0,2g
- Phosphate dipotassique 0,2g
- NaCl 1g
- Urée 4g
- Alcool 95° 2ml

Rouge phénol 0,05g (0,5ml de  
Solution à 1%)

Stériliser par filtration

→ **Milieu de CLARK et LUBS (VOGES PROSKAUER)**

- Formule : Peptone tryptique ou polypeptone 2,1g
- Pyruvate de sodium 1,84g
- Phosphate dipotassique 0,6g
- Fumarate disodique 0,6g
- Glucose 1,5g

Ajuster à pH 7 et filtrer

→ **Milieu pour la recherche de la nitrate réductase**

Il s'agit d'un bouillon nutritif nitraté.

Le bouillon nutritif à la formule suivante :

- Peptone 5 g / l
- Extrait de viande 3 g / l
- pH 7

- Mettre 1,5 g de milieu sec (bouillon nutritif) et 2 g de nitrate de sodium dans 100 ml d'eau distillée. Mélanger jusqu'à dissolution complète à chaud. Répartir puis stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

→ **Milieu pour la mise en évidence de l'attaque de l'esculine :**

- Peptone	20 g / l
- Citrate de fer ammoniacal	2 g / l
- Esculine	2 g / l
- pH	7,4

Stériliser à 110°C pendant 30 minutes

→ **Bouillon Hypersalé**

- Bouillon MH ou infusion de cœur	5g
- NaCl	13g
- Glucose	0,2g
- BCP (1,6 %)	200µl
- Eau distillée	100ml
- pH	7 - 7,2

- stérilisation à 121°C pendant 20 minutes.

→ **MILIEU A L'ONPG ( $\beta$  galactosidase)**

- Préparation solution tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  à pH 7

Dissoudre 13,8g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  dans 45ml d'eau distillée. Ajouter de la lessive de soude 36°B pour ajuster à pH 7 (6ml environ).

Compléter à 50ml avec de l'eau distillée et conserver à 4°C.

- Solution d'ONPG M/75

Dissoudre 160mg d'ONPG dans 15ml d'eau distillée portée à 50°C .

Laisser refroidir. Ajouter 5ml de la solution tampon .

Le mélange doit être incolore.

Conserver à 4°C.

Avant l'emploi , incuber à 37°C pour remettre le phosphate en solution.

### **d) Contrôle de qualité des milieux liquides**

Chaque lot de milieu préparé est soumis à un contrôle de stérilité et un contrôle d'efficacité sur le plan bactériologique (souches de référence et souches témoins)

#### **▪ Contrôle de stérilité**

Un millilitre de chaque milieu préparé est déposé dans des tubes à hémolyse stériles qui sont incubés à 37°C pendant 48 heures.

Les milieux sont considérés stériles en l'absence de trouble et virage de l'indicateur coloré.

#### **▪ Contrôle d'efficacité**

Il est réalisé avec des souches de référence et des souches témoins dont le profil biochimique est stable et bien connu.

Ainsi le milieu considéré comme stérile doit faire l'objet d'une étude en ce qui concerne sa capacité à donner un résultat positif ou négatif pour un caractère donné, avec des souches prévues pour cet effet.

#### **- Souches de référence et souches témoins**

##### **Souches de référence**

- *Staphylococcus xylosum*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus haemolyticus*
- *Staphylococcus cohnii*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Enterococcus faecalis*

### **Souches témoins**

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus agalactiae*
- *Streptococcus mitis*
- *Streptococcus sp*

## Les Staphylocoques

**Tableau II. Répartition des contrôles positifs et négatifs**

TESTS	TEMOINS POSITIFS	TEMOINS NEGATIFS
UREE	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
ADH	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus xylosus</i>
ODC	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
VP	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ONPG	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
NIT	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>
Glucose	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus sp</i>
Trehalose	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Mannitol	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus sp</i>
Xylose	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Saccharose	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>
Glycerol	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus sp</i>
Mannose	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Lactose	<i>Staphylococcus xylosus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Raffinose	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

## Les Streptocoques et Entérocoques

**Tableau III: répartition des contrôles positifs et négatifs**

TESTS	TEMOINS POSITIFS	TEMOINS NEGATIFS
VP	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ESC	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
ADH	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>
BHS	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Arabinose	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Mannitol	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Sorbitol	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Trehalose	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
Rafinose	<i>Enterococcus avium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Sorbose	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>
Inuline	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Lactose	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Ribose	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Amidon	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>
Glycérol	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus avium</i>

Pour le contrôle d'efficacité on utilise des plaques stériles, dont le plan est le suivant :

URE	ADH	ODC	VP	$\beta$ GAL
NIT	GLU	TREH	MAN	XYL
SAC	GLY	MANE	LAC	RAF

### **Plaque Staphylocoque**

VP	ESC	ADH	BHS	ARA
MAN	SOR	TREH	RAF	SOS
INU	LAC	RIB	AMD	GLY

### **Plaque Streptocoque et Entérocoque**

Deux plaques sont prévues pour chaque galerie (contrôles positifs et négatifs).

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

Une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture de 24 H sur milieu solide :

La turbidité de la suspension est ajusté à :

- 2 à l'échelle Mc Farland pour les staphylocoques
- 8 à l'échelle Mc Farland pour les streptocoques et entérocoques.

50µl de chaque suspension bactérienne sont déposés dans les puits correspondants de la plaque et ceci pour chaque galerie. Les cupules LDC, ODC, ADH, URE et tous les sucres sont fermés avec 2 gouttes d'huile de paraffine.

Les plaques sont ensuite déposées sur un plateau recouvert d'un papier buvard imbibé d'eau puis incubées à 37°C à l'étuve pendant 18-24h.

### **e) Déshydratation des milieux liquides**

#### **➤ Matériel**

- Microplaques de vingt puits
- Micropipette de 5 à 100 µl
- Un verre à pied rempli d'eau de Javel dilué
- Un plateau
- Des embouts stériles
- Etuve
- Bec Bunsen
- Hotte à flux laminaire horizontal
- Four à micro-ondes
- Un hygromètre digital

#### **➤ Procédés de déshydratation**

- **Préalables pour la déshydratation : standardisation des appareils**

- Nettoyage et désinfection de l'étuve à l'aide d'antiseptiques spéciaux (ou eau de Javel diluée ou encore alcool 70°).
- Désinfection de l'enceinte à UV

- Prises de températures régulières des réfrigérateurs et étuves matin et soir à la même heure.
- Contrôles réguliers de l'humidité de l'étuve à l'aide d'un Hygromètre digital.

- **Déshydratation**

La distribution des milieux se fait dans les mêmes plaques que celles utilisées pour le contrôle d'efficacité des milieux liquides.

- **Pour les staphylocoques ou distribue :**

- \*100 µl de milieu dans les puits correspondants, de Urée à Nitrate

- \*10 µl de sucre à 10 % dans les puits correspondants (de glucose à raffinose)

- **Pour les streptocoques et les Entérocoques ou distribue :**

- \*100 µl de milieu dans les puits correspondants, de VP à BHS.

- \*5 µl de sucre à 10 % dans les puits correspondants (ARA, SOR, TREN, RAF, SOR, INU, LAC, RIB, GLY)

- \*10 µl de mannitol à 10 % dans le puits correspondant.

- \*10 µl d'amidon à 5% dans le puits correspondant.

Les plaques sont ensuite mises dans une étuve portée à la température de 43°C.

La déshydratation se fait en présence d'un dessiccateur (silicagel).

L'humidité de l'étuve est contrôlée avec un hygromètre digital.

Dans ces conditions, les substrats sont déshydratés en moins de 18 heures

## ➤ **Contrôle de qualité des milieux déshydratés**

### - Contrôle de stérilité

Après 24 à 48 heures d'incubation et après révélation de certains tests, le lot est considéré stérile en l'absence de virage de l'indicateur et en l'absence de réaction positive pour les tests révélés.

### - Contrôle d'efficacité

Il est réalisé avec les mêmes souches bactériennes que pour le cas des milieux liquides.

A la différence des milieux liquides :

- L'inoculum bactérien est ajusté à 1 Mc Farland pour les staphylocoques et 4 Mc Farland pour les streptocoques et entérocoques

- Le milieu pour l'étude du métabolisme glucidique est préparé d'une façon normale (une fois concentrée)

- Pour les milieux n'étudiant pas le métabolisme glucidique, 100µl d'inoculum bactérien sont distribués dans les puits correspondants.

- Pour l'étude du métabolisme glucidique, 500µl d'inoculum bactérien sont incorporés dans un millilitre de milieu et 100µl du mélange sont distribués dans les puits correspondants.

## **2. Méthodologie**

### **2.1 Principe**

Les cupules des plaques renfermant les substrats déshydratés, permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques ou d'assimilation de substrats carbonés.

L'ensemencement avec un inoculum reconstitue le milieu. Après incubation, la lecture des réactions est effectuée directement (virage de l'indicateur coloré) ou après addition de réactif de révélation .

## **2.2 Préparation de l'inoculum**

La suspension bactérienne doit avoir une turbidité égale à 0,5 sur l'échelle ou Mc Farland dans 1,5ml d'eau distillée avec des colories d'une culture ou 18-24 heures sur milieu solide.

- 100µl d'inoculum bactérien par cupule de LDC à ONPG puis le reste de l'inoculum est mélangé et homogénéisé avec 1ml de MEVAG entérobactérie. La dernière préparation ainsi obtenue, les cupules allant de LACT à INO ont été inoculées.

- avec 2 gouttes de paraffine, les cupules LDC, ODC, ADN, UREE et tous les sucres sont fermés.

L'incubation est faite à 37°C sur un plateau recouvert de papier buvard imbibé d'eau.

## **2.3 Lecture**

Elle est faite 18 à 24h après l'incubation.

On utilise les plaques suivantes, préalablement stérilisées au four à micro-ondes.

URE	ADH	ODC	VP	BGAL
NIT	GLU	TRE	MAN	XYL
SAC	GLY	MNE	LAC	RAF

**Plaque staphylocoques**

VP	ESC	ADH	BHS	ARA
MAN	SOR	TREH	RAF	SOS
INU	LAC	RIB	AMD	GLY

### **Plaque Streptocoques et Entérocoques**

**Tableau IV : tableau de lecture des Staphylocoques**

Tests	Substrats	Réactions / enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
URE	Urée	Uréase		Rose framboise	Orange
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase		Rouge	Jaune
VP	Glucose + pyruvate	Production d'acétoïne	VP1+VP2	Rose-rouge	Incolore
ONPG	ONPG	Bêta-galactosidase		Jaune	Incolore
NIT	Nitrate de K	Nitrate réductase	G1 +G2	Rouge	Incolore
GLU TRE MAN XYL SAC GLY MNE LAC RAF	Glucose Tréhalose Mannitol Xylose Saccharose Glycérol Mannose Lactose Raffinose	Fermentation		Jaune	Rouge

**G1 = 1 goutte d'acide sulfanilique**

**G2 = 1 goutte d'alpha naphthylamine**

**Tableau V : tableau de lecture des Streptocoques et Entérocoques**

Tests	Substrats	Réactions/ enzymes	Réactifs de révélation	Résultats positifs	Résultats négatifs
VP	Glucose + pyruvate	Production d'acétoïne	VP1 + VP2	Rose-rouge	Incolore
ESC	Esculine	Bêta-glucosidase		Noir	Incolore
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase		Rouge	Jaune
BHS	Glucose	Croissance en milieu hypersalé		Jaune	Violet
ARA MAN SOR TRE RAF SOS INU LAC RIB AMD GLY	L- Arabinose Mannitol Sorbitol Tréhalose Raffinose Sorbose Inuline Lactose Ribose Amidon glycérol	Fermentation		Jaune	Rouge

## II / Etude de la sensibilité

### 1) Principe

Une bactérie attaquant le glucose a été incubée dans le bouillon MH (contenant du glucose) en présence de deux concentrations critiques d'un antibiotique donné (ou une concentration selon l'antibiotique).

Après 18 heures, la croissance a été décelée et traduite grâce à un indicateur coloré, le rouge de phénol (qui passe du rouge au jaune).

### 2) Préparation du milieu utilisé

Nous avons utilisé un bouillon MH supplémenté en calcium et en magnésium.

La formule pour un litre est la suivante :

- bouillon MH 50g
- glucose 4g
- rouge de phénol 100mg (ou bien 100ml d'une solution à 1%)
- solution de  $MgCl_2$  à 25mg (2,5ml)
- solution de  $CaCl_2$  à 50mg (5ml)
- eau distillée qsp 1000ml

pH  $7,4 \pm 0,2$

Le bouillon MH contenant le glucose et le rouge de phénol a été autoclavé à  $115^\circ C$  pendant 15 mn. Les solutions de  $MgCl_2$  et  $CaCl_2$  ont été ajoutées au milieu autoclavé après avoir été stérilisées par filtration.

### 3) Préparation des solutions d'antibiotiques

#### 3-1 Solutions de stock

- Principe

Il repose sur la préparation d'une solution mère 200 fois plus élevée que la concentration critique supérieure (CCS) de l'antibiotique considéré, dans le solvant approprié .

Les préparations standards ou de référence doivent être obtenues directement des fabricants ou des firmes qui distribuent la poudre uniquement pour test de sensibilité .

- Préparation

Les masses à peser dépendent de l'activité de ces antibiotiques. L'activité de l'antibiotique est la quantité de principe actif en  $\mu\text{g}$  contenue dans un mg de produit.

La formule que nous avons utilisé pour préparer ces solutions est la suivante :

$$\text{Quantité à peser (mg)} = \frac{\text{Volume en ml} \times \text{concentration (mg/ml)}}{\text{Activité ( } \mu\text{g/mg)}}$$

Pour les antibiotiques choisis, les concentrations à préparer sont répertoriées dans le tableau suivant.

### **3-2 Concentration critique supérieure (CCS)**

La solution de stock contient la quantité requise de produit pour obtenir, par une dilution au 1/100<sup>ème</sup> avec le diluant approprié et une dilution ultérieure au ½ par le milieu utilisé dans la cupule.

### **3-3 Concentration critique inférieure (CCI)**

Elle est obtenue pour chaque antibiotique en faisant une dilution de la concentration critique supérieure. La dilution à effectuer est fonction de la CCS et de la CCI donc de l'antibiotique.

- Préparation de l'inoculum

Nous avons fait une suspension de quelques colonies dans de l'eau distillée stérile. Ces colonies ont été obtenues à partir d'une colonie pure de 24h sur gélose MH.

Cette suspension a été ajustée de façon à obtenir une opacité équivalente à 0,5 sur l'échelle Mac Farland ( $10^8$  bactéries / ml).

Cet inoculum a été dilué dans le milieu d'étude de la sensibilité à son tour de façon à obtenir un inoculum final de  $10^5 - 10^6$  bactéries / ml.

Cette phase est très importante, car il faut nécessairement travailler sur une souche pure et avoir un inoculum standard.

- Inoculation de la plaque

- 80µl du double de la CCS d'un antibiotique donné ont été déposés dans la cupule supérieure ( C) de la plaque et 80µl du double de la CCI du même antibiotique dans la cupule opposée ( c)
- procéder de la même manière pour les autres antibiotiques possédant une seule concentration (exemple Oxacilline)
- 80µl de l'inoculum bactérien ont été ajoutés

- La plaque a été incubée pendant 16 à 18h à 37°C sur papier buvard humide

- Lecture et identification

La lecture se fait à l'œil nu au bout de 16 à 18h d'incubation à 37°C .

Pour chaque antibiotique, la bactérie est soit :

- sensible (milieu rouge dans les cupules C et c).
- intermédiaire (milieu jaune dans c et milieu rouge dans C)
- résistante (milieu jaune ).

Pour les antibiotiques à concentration unique, la bactérie est soit :

- sensible (milieu rouge)
- résistante (milieu jaune)

### **3-4 Contrôle de qualité**

#### **a) Stérilité**

Ainsi, 1 ml du milieu nouvellement préparé a été incubé à 37°C pendant 18 à 24h. le milieu est considéré comme stérile en l'absence de virage de l'indicateur coloré.

#### **b) Efficacité**

Elle se traduit par la capacité du milieu à passer du rouge au jaune en présence de bactéries utilisant le glucose comme les Staphylocoques pendant 18 à 24h à 37°C.

#### **c) Reproductibilité**

Chaque fois qu'un milieu a été préparé, des souches de référence ont été testées exemple : *S. aureus* ATCC 29213

#### **d) Stabilité**

- **Milieu préparé**

La conservation du milieu d'étude de la sensibilité a été faite à 4°C. A cette température il reste stable (stérile et efficace) pendant longtemps (8 semaines)

- **Antibiotiques**

Les poudres ont été conservées selon les directives du fabricant (0 – 5°C ou température ambiante). Elles restent stables pendant longtemps.

Les solutions de stock ont été conservées à –20°C. Dans ce cas la stabilité de ces solutions peut aller jusqu'à 6 mois au moins sauf pour l'ampicilline et l'amoxicilline qui ne peuvent être stockés à cette température que pendant 6 semaines.

**Tableau VI : Concentration des solutions de stock et préparation des solutions de travail**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Solution de stock en mg/ml</b>	<b>CCS <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	<b>Dilution</b>	<b>CCI <math>\mu\text{g/ml}</math></b>
Pénicilline G	3,2	16	1/64	0,25
Oxacilline	0,4	2	1/2	1
Amoxicilline	6,4	32	1/8	4
Ceftriaxone	6,4	32	1/8	4
Amikacine	3,2	16	1/2	8
Gentamicine	1,6	8	1/2	4
chloramphénicol	3,2	16	1/2	8
Ciprofloxacine	0,4	2	1/2	1
Erythromycine	0,8	4	1/4	1
Tétracycline	1,6	8	1/2	4

**Tableau VII: solvant et diluant des antibiotiques**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Solvant</b>	<b>Diluant</b>
Pénicilline G	Eau	Eau
Oxacilline	Eau	Eau
Amoxicilline	Tampon phosphate 0,1M (pH6)	Eau
Ceftriaxone	Eau	Eau
Amikacine	Eau	Eau
Gentamicine	Eau	Eau
Chloramphénicol	Méthanol	Eau
Ciprofloxacine	NaOH 0,1M	Eau
Erythromycine	Eau	Eau
Tétracycline	Eau	Eau

## **TROISIEME PARTIE :RESULTATS**

Notre étude qui s'est déroulée au laboratoire de Bactériologie- Virologie du C.H.U. Le Dantec de Dakar a porté sur l'identification et l'étude de la sensibilité des souches de staphylocoques , entérocoques et streptocoques.

### **I / Identification**

#### **1- souches étudiées**

L'évaluation a porté sur les souches déjà identifiées par les méthodes conventionnelles.

Nous avons eu à identifier 44 souches de staphylocoques, 22 souches d'entérocoques et 42 souches de streptocoques .

La répartition des souches bactériennes par genre et espèce est donnée par le tableau VIII

**Tableau VIII : Répartition des souches de cocci à Gram positif testées**

<b>Staphylococcus</b>	<i>S. aureus</i>	16
	<i>S. epidermidis</i>	10
	<i>S. haemolyticus</i>	7
	<i>S. hominis</i>	6
	<i>S. saprophyticus</i>	5
	<i>S. simulans</i>	4
	<i>S. warneri</i>	2
	<i>S. xylosus</i>	3
<b>Total</b>		<b>44</b>
<b>Enterococcus</b>	<i>E. faecalis</i>	10
	<i>E. faecium</i>	5
	<i>E. durans</i>	4
	<i>E. avium</i>	3
<b>Total</b>		<b>22</b>
<b>Streptococcus</b>	<i>S. pneumoniae</i>	5
	<i>S. pyogenes</i>	7
	<i>S. agalactiae</i>	5
	<i>S. milleri</i>	4
	<i>S. mitis</i>	3
	<i>S. salivarius</i>	4
	<i>S. sanguis</i>	5
	<i>S. bovis</i>	4
	<i>S. B</i>	5
<b>Total</b>		<b>42</b>

## **2- Caractères biochimiques d'identification**

La microméthode repose sur des réactions chromogènes donc le choix de l'indicateur coloré est important pour l'étude de l'assimilation des hydrates de carbone, de la synthèse de différents enzymes : décarboxylase, uréase.

**Voir tableaux IX et X**

## **3- Concentration des milieux**

L'étude des différentes concentrations des constituants des milieux, s'impose pour connaître la composition la plus économique permettant une bonne identification.

Selon le protocole, il existe une composition standard des différents milieux recensés par la microméthode **(49)**.

## **4- Lecture**

Après 16h d'incubation, l'identification des souches a été effectuée avec un taux de 100% de concordance. A la 18<sup>ème</sup> heure l'identification était toujours faite avec 100% de concordance. A la 24<sup>ème</sup> heure, l'identification était similaire à celle obtenue à la 16<sup>ème</sup> heure. Nous avons observé des profils ininterprétables à la 48<sup>ème</sup> heure.

## **5- Evaluation**

Elle est effectuée avec les souches de référence qui devait présenter le même profil biochimique après une série d'identification par la microméthode.

La microméthode utilise plus de 20 caractères biochimiques pour l'identification contrairement aux galeries classiques .

**Tableau IX: identification des staphylocoques (en paysage)**

URE	ADH	ODC	VP	ONPG	NIT	GLU	TRE	MAN	XYL	SAC	GLY	MNE	LAC	RAF	ESPEC
+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	S. aureus
+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	S. epidermid
-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	S. haemolyti
-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	S. hominis
+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	S. saprophyt
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	S. simulans
+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	S. warneri
+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	S. xylosus

**Tableau X : Identification des Streptocoques et Entérocoques**

VP	ESC	ADH	BHS	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	SOS	INU	LAC	RIB	AMD	GLY
-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+
-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-

## II / Sensibilité

### 1/ Souches bactériennes

Nous avons testé 10 antibiotiques sur des souches de staphylocoques, entérocoques et streptocoques. Ces souches testées donnent des sensibilités variables vis à vis des familles d'antibiotiques.

L'étude a porté sur 54 souches dont 27 staphylocoques , 13 entérocoques et 14 streptocoques

<b>Souches</b>	<b>Nombre</b>
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	12
<i>S. aureus</i> 512	10
<i>S.epidermidis</i>	5
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	8
<i>S. pyogenes</i>	6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7
<i>E. faecium</i>	6

## **2 / Antibiotiques utilisés**

### **2-1 Définition et classification**

Un antibiotique est un composé isolé d'un organisme vivant et qui peut inhiber le développement d'autres microorganismes ou alors les détruire. La classification repose sur la structure chimique et le mécanisme d'action, lesquels conditionnent les spectres d'activité **(26, 40)**.

### **2-2 Mécanisme d'action**

#### **a) Les bêtalactamines**

Ce sont des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane qui est un constituant de la paroi bactérienne.

#### **b) Les aminosides**

Les aminosides perturbent la synthèse protéique au niveau du ribosome, en particulier au niveau de la sous-unité 30 S.

#### **c) Les tétracyclines**

Leur action se traduit par une inhibition des synthèses protéiques au niveau des ribosomes. Ils se lient aux protéines de la sous-unité 30 S mais peuvent aussi se lier en faible proportion aux protéines de la sous- unité 50 S **(9)** .

**d) Les phénicolés**

Ils inhibent la synthèse des protéines en se liant de façon réversible aux ribosomes en particulier au site A de la sous-unité 50 S.

**e) Macrolides**

Ils inhibent les synthèses protéiques ARN dépendant du site P de la sous-unité 50S du ribosome **(45)** . Les étapes de translocation et de transpeptidation sont inhibées.

**f) Les quilonones**

Ils bloquent la synthèse des acides nucléiques par l'inhibition de l'ADN gyrase.

Parmi les antibiotiques testés, nous avons :

- Pénicilline G
- Amoxicilline
- Oxacilline
- Ceftriaxone
- Erythromycine
- Ciprofloxacine
- Chloramphénicol
- Gentamicine
- Amikacine
- Tétracycline

### 3 / Profil de sensibilité

**Tableau XI : Activité des antibiotiques sur les bactéries en paysa**

Antibiotiques	Staphylocoques			Entérocoques			Streptocoqu
	S	I	R	S	I	R	S
Ceftriaxone	13	5	9	6	4	3	9
Pénicilline G	14	3	10	7	2	4	10
Amoxicilline	10	7	10	7	3	3	10
Oxacilline	19	0	8	6	0	7	8
Erythromycine	20	4	3	6	5	2	4
Ciprofloxacine	21	4	2	2	4	7	5
Chloramphénicol	10	2	15	3	7	3	7
Tétracycline	19	4	4	3	4	6	5
Amikacine	15	5	7	5	3	5	6
Gentamicine	16	4	7	6	4	3	7

#### - Les bêta-lactamines

La résistance des Staphylocoques à la Pénicilline G est élevée avec 56% des souches, le reste est réparti en souches intermédiaires et en souches sensibles . seule une faible partie des Streptocoques et Entérocoques résiste à la pénicilline .

Les souches de Staphylocoques sont pour la plus part sensibles à la Ceftriaxone de même que les Streptocoques et Entérocoques.

La sensibilité des Staphylocoques aux deux antibiotiques pénicilliniques est de 50% pour l'amoxicilline et 55% pour l'Oxacilline . Les taux varient avec les Streptocoques et Entérocoques.

#### - Les macrolides

L'action de l'Erythromycine sur les Staphylocoques donne des résultats satisfaisants avec 80% de souches inhibées. Chez les Streptocoques 50% des souches sont résistantes.

#### - Les aminosides

La Gentamicine a donné de bons résultats sur les Staphylocoques et Entérocoques. On note aussi que l'Amikacine est bien indiqué dans les infections Staphylococciques.

#### - Les cyclines

La Tétracycline s'est avérée efficace sur les staphylocoques, avec un faible taux d'inhibition sur les souches de streptocoques et Entérocoques .

#### - Les quinolones

La Ciprofloxacine a donné une excellente activité sur l'antibiothérapie des infections Staphylococciques, avec plus de 80% des souches inhibées. On note un manque d'efficacité avec les souches d'Entérocoques qui y résistent.

#### - Les phénicolés

Le Chloramphénicol s'est montré efficace sur les souches des Staphylocoques et Entérocoques.

#### **4- Contrôle de qualité**

##### **a) Stérilité**

Le milieu nouvellement préparé fait l'objet d'un test de stérilité, s'il y a virage de l'indicateur coloré dans la cupule témoin nonensemencée, le milieu est éliminé car considéré comme non stérile.

##### **b) efficacité**

Le milieu stérile a été soumis à un contrôle d'efficacité. Nous avons constaté que les milieux préparés passent du rouge au jaune en présence de bactéries attaquant le glucose.

##### **c) Reproductibilité**

Ce test a été effectué avec les souches de référence.

##### **d) Stabilité**

Le milieu préparé et conservé à 4°C est resté stable pendant longtemps si les contrôles de stérilité et d'efficacité ont été satisfaisants.

## QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

### A / Identification

L'étude comparative menée dans le contrôle d'efficacité entre notre méthode et le système API montre une bonne concordance pour les réactions produites avec les souches de contrôle négatif.

Cela met en exergue la stérilité des substrats.

Une concordance globalement satisfaisante pour les réactions produites avec les témoins positifs traduit la stabilité des caractères testés chez les souches .

En effet, nous avons eu 98% de concordances avec les Staphylocoques, Entérocoques et Streptocoques.

Nous avons noté des discordances inhérent à la sensibilité de certains tests (VP).

La lecture du VP se fait au bout de 20 à 30 mn après addition des réactifs de révélation pour la microméthode ; alors qu'elle est de 10mn avec les galeries API.

Les faibles volumes de substrat dans les microméthodes peuvent poser des problèmes avec les germes à croissance difficile (streptocoques). C'est la raison pour laquelle, il est préparé une suspension bactérienne dense à l'échelle 4 Mac Farland. Ce qui permet d'avoir une expression métabolique suffisante en compétition avec une éventuelle lyse bactérienne.

Les caractères biochimiques ont été choisis à partir de la méthode de KLOO et SCHLEIFER. Ce choix rejoint la pensée de KLOOS et LAMBE pour l'identification des Staphylocoques.

Ces caractères sont retrouvés dans la plupart des microméthodes existants sur le marché, à l'instar de l'API STAPH **(49)** du système microscan **(39)**,

système Miniték modifié, API STAPH – Ident system **(43)**, Automicrobic **(4)** et du STAPH – sistem 18 – R **(60)**.

Le choix de l'indicateur a porté sur le rouge de phénol qui a montré une plus grande stabilité lors de la conservation et de la déshydratation des milieux **(43, 52, 36, 59)**.

La concentration du milieu a été donnée par Mounier et Coll **(52)** avec les milieu concentrés , il se posait un problème stabilité avec l'assimilation des sucres ( Xylose et mannitol) et la nitrate .

BALE M. J. et ses collaborateurs **(10)** ont déjà montré l'avantage de l'identification des germes par une microméthode sur celle effectuée par les méthodes conventionnelles.

La déshydratation a permis d'obtenir une meilleure stabilité facilitant ainsi leur conditionnement et l'utilisation des microplaques.

Les résultats du contrôle de qualité confèrent à notre méthode une reproductibilité, une stabilité et une fiabilité superposables aux galeries classiques.

La manipulation dure 3 mn et la lecture se fait après 16 heures d'incubation.

## **B / Sensibilité**

Notre choix pour le bouillon MH supplémenté en ions ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) inspire des recommandations faites par différents auteurs **(17, 22, 71)** dans le cadre de l'étude de la sensibilité en milieu liquide.

Le glucose, constituant essentiel du milieu, est un sucre utilisé pour la plus part des bactéries. Son utilisation par les micro-organismes conduit à la production d'acide.

Cette production a été mise en évidence par un indicateur coloré le rouge de phénol. Il a permis une lecture facile avec un virage franc (du rouge au jaune) en cas de croissance bactérienne. La zone de virage du rouge de phénol doit correspondre aux variations de pH du milieu (6,8 à 8,4).

Ce n'est que lors de la dilution extemporanée des antibiotiques qu'un choix minutieux est effectué en tenant compte du comportement des germes vis à vis des antibiotiques disponibles. Les antibiotiques choisis doivent être stables et actifs au cours des tests.

Les concentrations critiques retenues pour ce travail ont permis une catégorisation clinique en sensible, intermédiaire et résistant.

Les concentrations critiques utilisées sont celles tirées du Whonet V.

Les poudres sont conservées selon les directives du fabricant, elles restent stables jusqu'à leur date de péremption.

Quant aux solutions mères, elles ont été conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  comme le suggèrent DHOROTY . et coll. **(25)** pour une conservation à court terme.

Ces auteurs recommandent de conserver à cette température pour une période de 6 semaines pour l'ampicilline et l'amoxicilline et de 6 mois pour les autres antibiotiques , et à  $-70^{\circ}\text{C}$  pour une longue conservation.

### Inoculum bactérien

La préparation de l'inoculum bactérien constitue une étape importante dans l'étude de la sensibilité des germes aux antibiotiques.

Il est impératif de travailler sur une souche pure et jeune et de standardiser la concentration finale de l'inoculum car comme l'a montré NIASSE M.F. **(57)**, il y a une variation importante de la sensibilité en fonction de l'inoculum.

D'après les recommandations **(3, 22)** nous avons fixé la concentration de l'inoculum entre  $10^5$  et  $10^6$  bactéries/ml soit l'étalon Mac Farland 0,5 .

La lecture se fait au bout de 16 à 24 heures.

Le test de reproductibilité décrit par plusieurs auteurs **(21, 54, 55)** est de près de 90 %, ce qui montre une bonne standardisation de la microméthode .

En effet, DOROTHY J. et COLL rapportent que les bêtalactamines se conservent mieux à  $-70^{\circ}$  C.

DUVAL J. **(26)** a montré que les tétracyclines forment avec les ions  $Mg^{2+}$  des complexes.

Par ailleurs pour QUENTI C. **(62)**, les méthodes par dilution à 2 concentrations donnent principalement des discordances avec les tétracyclines et le cotrimoxazole.

NICHOLAS E. REIBER et coll. **(58)** n'ont obtenu que 20 % de résultats concordants avec les tétracyclines.

Le pH optimum est de 6,25 au lieu de 7,4 ( pH du milieu d'étude ).

L'étude comparative avec le E-test méthode de référence montre une concordance de 90% ce qui est confirmé par de nombreuses études **(1,2,6)**.

Le E-test est une technique facilement réalisée et qui a donné d'excellents résultats lorsqu'on le compare à la dilution en gélose **(16, 24, 50, 58)** .

Sur un total de 54 tests de sensibilité aux antibiotiques effectués à la fois par la microméthode et le E-test , nous avons obtenu des discordances d'ordre mineur. Les discordances mineures sont celles où un résultat « résistant » ou « sensible » par une méthode est donné « intermédiaire » par une autre méthode.

## CONCLUSION

Le diagnostic est le traitement des maladies infectieuses imposant l'identification correcte de l'agent étiologique et l'étude « **in vitro** » de la sensibilité aux antibiotiques , en vue d'une prise en charge thérapeutique .

C'est dans cette optique que nous avons mis au point une micro méthode d'identification et d'étude de la sensibilité des **Staphylocoques** ,

**Entérocoques** et **Streptocoques** répondant d'une part aux normes scientifiques et d'autre part aux exigences financières de nos laboratoires .

Nous avons eu à identifier **44** Staphylocoques , **22** Entérocoques et **42** Streptocoques par la micro méthode .

En effet , il s'agit d'une méthode miniaturisée permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques , la fermentation des sucres et de la croissance en milieu hostile .

Avec 15 tests biochimiques, la micro méthode d'identification permet de faire un diagnostic de groupe ou d'espèce .

Elle utilise un indicateur coloré dont la zone de virage coïncide le plus possible avec les variations du pH du milieu .

La micro méthode use tous les caractères biochimiques que possèdent la galerie classique . Ce pendant d'autres caractères y sont greffés.

Les milieux déshydratés contrairement aux milieux liquides donnent une meilleure stabilité et facilitent l'usage de la micro plaque .

Elle présente l'avantage de ne pas nécessiter de test complémentaire par rapport à la galerie classique. La réalisation du test dure 3 à 4 mn et la lecture se fait après 16 h d'incubation .

Notre étude réalisée au laboratoire de Bactériologie – virologie nous a permis d'identifier **108** souches puis de tester la sensibilité de **54** souches vis à vis de dix antibiotiques .

Le milieu d'étude de la sensibilité est constitué de MH ,glucose , rouge phénol , supplémenté en ions Calcium et magnésium

La micro méthode d'étude de la sensibilité utilise un indicateur coloré (rouge de phénol) pour détecter la croissance des bactéries assimilant le glucose contenue dans des cupules de micro plaque et présence de deux concentrations d'antibiotiques . (CCI et CCS)

Elle a présenté une bonne reproductibilité avec les souches de référence . Elle est superposable à la méthode de référence E-test avec 90 % de concordances des résultats .

Nul doute que le choix de la micro méthode a été judicieux et les résultats fournis par ce processus assez simple et de réalisation aisé peuvent être qualifiés de fiables .

Dans notre étude de validation , la micro méthode apparaissait comme étant une excellente alternative à la méthode de référence

## BIBLIOGRAPHIE

### 1- ACAR J.

Tableaux synoptiques des pièges de l'antibiogramme

XXIV<sup>e</sup> Journée de Biologie praticienne.

Paris, 08 Dec, 1990

### 2- ACAR J. ; SWIFT R. ; MC KIE J. ; QUENTIN CL.

Sensibilité des bactéries aux antibiotiques : évaluation d'une méthode automatisée .

Path. Bio. , 1978, 26 (2) : 137- 144

### 3- ALAN R. OAKES ; ROSALIND B. ; AND DAVID I. G.

Comparison of direct and standardized testing of Infected Urine for Antimicrobial Susceptibilities by Disk Diffusion

J. Clin. Microbiol., 1994 ; 32 (1) : 40-45

### 4- ALMEIDA J. ; JORGENSEN J. H. ; AND JOHNSON J. E.

Evaluation of the Auto Microbie System Gram Positive

Identification of coagulase negative Staphylococci

J. Clin. Microbiol , 1993 , 18 (2) : 438-439

### 5- ARMENGAUD M. , CHAMBON L. ; BAYLETR. J. ; LOUVAIM.

Etude sur les angines dans la région dakaroise

**6- AUGÉ B. ; TRAVERT M. F. ; AVRIL J. L.**

Identification et antibiogramme rapide des entérobactéries à l'aide d'un système automatisé

Ann. Biol. Clin. 1986 ; 44 : 239-241

**7- AVRIL J. L. ; DABERNAT H. ; DENIS F. ; MONTEIL M.**

Bactériologie clinique

Edition Marketing, Paris , 1988, 49-52

**8- AVRIL J. L. ; PLAISANCE J.**

Caractères cultureux et biochimiques des Streptocoques .

Sensibilité aux antibiotiques .

Med. Mal. Infect., 1980, 10, 627-632

**9- AZELE FERRON**

Bactériologie médicale

Edition C et R (13<sup>ème</sup> ) ; 1989

**10- BALE M. J. ; AND MAJSEN J. M.**

time motion and cost comparison study of Micro-ID

Api 20E, and conventional biochemical testing in Identification of *enterobacteriaceae*

J. Clin, Microbiol, 1981, 14 : 6665-670.

**11- BALLE B.**

Sensibilité des mycoplasmes uro-génitaux aux antibiotiques

Thèse Pharm , Dakar, 1999, n°48.

- 12- BANNERMAN T. L., KLEEMAN K. T. ; AND KLOOS W. E.**  
Evaluation of the Vitek System Gram Positive  
J. Clin. Microbiol, 1993, 31 (5) : 1322-1325
- 13- BERCHE P. , GALLARD J. L. , SIMONET M.**  
MESURE DE l'activité antibactérienne des antibiotiques.  
Bactériologie : Bactéries des Infections humaines ,  
Paris , Médecine Science, Flammarion ; 1998 : 593-600
- 14- BLOCK P. , AND CIE**  
Catalogue Poly-labo, ed. 1994
- 15- BRUN Y. ET BES M.**  
Méthodes diagnostiques des Staphylocoques coagulase négatifs  
Med. Mal. Inf. 1990, hors série Mars : 16-23
- 16- CAROLYN N. BAKER , SHEILA A. STOKER, DAVID H.**  
Comparison of the E-test to Agar Dilution , broth microdilution and Agar  
Diffusion.  
J. Clin . Microbiol, 19991, 29 (3) : 533-538
- 17- CAROLYN N. BAKER , THORNSBERRY CL. ;DANNIE G. ; HOLLIS.**  
Antimicrobial Susceptibility testing of *Francisella tularensis* with a  
Modified Mueller-Hinton Broth  
J. Clin. Microbiol., 1985 ; 22 (2) : 210-215

- 18- CASHMAN J. S. , SMITH C. B., WEIDNER M. ; AND MATSEN J. M.**  
Evaluation of cost-effectiveness and rationale for use a selective culture plate for isolation of staphylococcus from stool specimens .  
J. Clin. Microbiol, 20 (3) : 570-571
- 19- CDC PREVENTION GUIDELINES**  
VRE : recommendations of the HIPAC, 1995, , 22 : 09
- 20- CORREA P. ; DAVID A. P. ; CHIRON J. P.**  
Recherche des Streptocoques hémolytiques chez les femmes enceintes et les nouveau-nés à Dakar  
Med, 1979, 24, 186-187
- 21- COURVALIN P. , GOLDSTEIN F. , PHILIPPON A. SIROT J.**  
Fiches techniques d'étude pratique des antibiotiques n° 4  
1<sup>ère</sup> édition , Pais , Mpc Vit , 1985 : 177-188
- 22- DANIEL F. ; SAHM, JOHN A.**  
Antimicrobial susceptibility test : dilution methods  
Eds Manual of clinical microbiology  
Washington DC, ASM , 1991 : 1105 – 1115
- 23- DENIS F. ; SAMBA A. ; CHIRON J. P. ; DIOP MAR I.**  
Infections à Streptocoques en Afrique vues par les laboratoires  
Bull. Soc. Med. Afr. , 1978, 23, 347-350

**24- DIANE M. ; MARGARETA I. , OSTOVARI**

Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobia bacteria  
J. Clin microbiol, 1991, 29 (10) : 2197-2203

**25- DOROTHY J. ; NICHOLAI ; CLAUDIA J. ; LAMMEL.**

Effects of storage temperature and pH on the stability for eleven bêta-lactams Antibiotics in NIC Trays  
J. Clin. Microbiol, 1985, 21 (3) : 366-370

**26- DUVAL J.**

Classification et mécanisme d'action des agents antimicrobiens in LE  
MINOR et VERON.

Bactériologie médicale . Med. Science

Flammarion 2<sup>ème</sup> édition 1989.

**27-ENCYCLOPEDIE MEDICALE DE LA FAMILLE**

Larousse , sélection du Reader's Digest, 1991.

**28-ESPOSITO S. ; NOVIELLO S. ; IANNIELLO**

In vitro activity of Moxofloxacin compared to other fluoroquinolones against  
different Erythromycin- Resistant Phenotypes of GABHS (1998).

**29-ETIENNE J. ; FOREY F. ; BES M. ; BRUN Y.**

marqueurs épidémiologiques des Staphylocoques

Med. Mal. Inf, 1990 , 24-28

**30-FERRON A .**

Bactériologie médicale

Editions C et R , 15<sup>ème</sup> ed , 1994

**31-FLEURETTE J.**

Staphylocoques et microcoques

Bactériologie médicale

Flam. Med. Science. ,Paris 1<sup>ère</sup> ed 1982

**32-FLEURETTE J.**

Taxonomie et écologie des Staphylocoques

Med. Mal. Inf., 1990.

**33-FLORES M. R. ; HALEY J. A., ROOST . W. ; LEE H.**

VRE : approach to treatment and control

J. 1996 ; 3 (1) : 1-8.

**34-FOURNIER J. M.**

*S. aureus*

In cryz S. J. Jr ; vaccines and Immunotherapy

Pergamon Press, 1991 : 166-177

**35-FRANÇOIS N. S. , MAINARDI J. L.**

*E. faecalis* : Aspect bactériologique , épidémiologique et thérapeutique.

Feuil. Biol. 1998, 39 (220) : 21-26

**36-GIGER O., CHARILAOU C. ; AND CUNDY K. R.**

Comparison of the API Staph-Ident and DMS Staph- Trac Systems

J. Clin microbiol 1984, 19 (1) : 68-72

**37-HORAUD T. ; LE BOUGUENEC C.**

*Streptococcaceae*

Bactériologie médicale Paris Flam. 1989

**38-HORODNICEANU T. ; DELBOS F. ; CHABBERT Y. A.**

Souches des Streptocoques isolées et sensibilité aux antibiotiques

Ann. Microbiol ., Inst Pasteur 1977 : 205-206

**39-HUSSAIN Z. ; STOAKES L. ; STEVENS D. L.**

Comparison of the Microscan System with API Staph Ident

J. Clin. Microbiol, 1984, 19 (1) : 68-72

**40-KENNETH TODAR**

Bacteriology 330 : lecture Topics : Antimicrobial agents 1996

**41-KLOOS W. E. ; AND BANNERMAN T. L.**

Update on clinical significance of coagulase negative Staphylococci

J. Clin. Microbiol-Rev, 1994, 7 (1) : 117-140

**42-KLOOS W. E. AND LAMBE JR . D . W.**

Staphylococcus

In manual of clinical microbiology, 4<sup>th</sup> ed

Am. Soc. For Microbiology , 1981 : 222-235

**43-KLOOS W. E. AND WOLFSHOAL J. F.**

Identification of Staphylococcus with API Staph  
J. Clin. Microbiol, 1982 , 16 (3) : 503-516

**44-LECLERC QR.**

Epidémiologie des infections à entérocoques  
Med. Mal. Inf 1994, 24 : 199-206

**45-LECLERC R., COURVALIN P.**

Intrinsic usual resistance to MLS Antibiotics in bacteria.  
Antimicrobs Agent chemother 1991 : 35 : 1273-1276

**46-LEMINOR L. ; VERON M.**

Bactériologie médicale  
Flam. ; Med. Science , Paris 1989

**47-LEPERLIER C. PARIS I. M. ; DESMETTES J. F.**

Résistance bactérienne  
L'objectif médical 1996

**48-MARA M.**

Etude des maladies streptococciques en Afrique occidentale .  
Thèse Med., Dakar , 1973 n° 26

**49-MARCHAL N. ; BOURDON J. L. ; RICHARD C. L.**

Milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries

Doin Editeurs 1987

**50-MARTHA L. ; SANCHEZ ; MARYS BAIRETT. ; RONALD N. JONES**

The E-test applied to Susceptibility test of Gonococci ,

Diagn. Microb. Inf, 1992 : 459-463

**51-MAY HALL C. G.**

Prevention and control of Vancomycin resistance in Gram Positive coccal microorganisms : fire fighting.

Infect. Contro. Hosp. Epidemiol. 1996, 17 : 353-355

**52-MOUNIER M. DENIS F.**

Les cocci à Gram positif

Dans Bactériologie Médicale – Techniques usuelles

SIMEP (ed), 1987 , 105-116

**53-NOVICK R. P.**

Staphylococci

In Microbiology, 4<sup>th</sup> ed, 1990 : 539-560

**54-NDAO S. K.**

Mise au point d'une microméthode biochimique d'identification des

Staphylocoques

Thèse Pharm, Dakar, 1993, n°44

**55-NDIR I.**

Mise au point d'une microméthode d'identification des Entérobactéries  
Thèse Pharm, Dakar ,1993, n°5

**56-NDIAYE Y. K.**

Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques et de la résistance par  
sécrétion de bêta-lactamases à spectre élargi de souches de bacilles à  
Gram négatif au C.H.U. da Dakar  
Thèse Pharm, Dakar, 1993, n° 95

**57-NIASSE M. F.**

Etude de l'effet inoculum sur la variation de la sensibilité des germes aux  
antibiotiques  
Thèse Pharm , Dakar, 1993 , n°17

**58-NICHOLAS E. ; REIBER ; MICHAEL T. ; KELLY. ;JOAN M. L.**

Comparison of the Cathra Repliscan II, the automicrobie system Gram  
negative general susceptibility plus Card, and micromedia system fox  
panel for dilution susceptibility testing of Gram negative bacilli  
J. Clin. Microbiol., 1985 ; 21 (6) : 959-962

**59-PARISI J. T. ; LAMPSON B. C.**

Comparison of Epidemiology markers for *S. epidermidis*  
J. Clin. Microbiol. ,1986, 24 (2) : 56-60

**60-PICCOLOMINI R. ; CATAMO G.**

Evaluation of staf-system 18R for identification of Staphylococcal clinical isolates to species level

J. Clin. Microbiol, 1994, 32 (3) : 649-653

**61-POTEL G. ; BARON D.**

Infections à Staphylocoques

EMS, Mal. Infect. 8001 A 10, 1990, 18p

**62-QUENTIN cl.**

L'antibiogramme en urgence

Eds. : l'antibiotigramme , 1<sup>ère</sup> ed. , Paris , MPC Videon ; 1985.

**63-RAPHENON G.**

Forum médical, 1984, 19 (3) : 318-320

**64-SANKALE M. , KOATE P.**

Cardiopathie rhumatismale chez le noir africain

Med. Afr. noir , 1970.

**65-SCHLEGEL L. ; BOUVET A.**

Streptocoques et genres apparentés

Bull. Soc. for microbiol , 1998.

**66-SCHROETER G. ; ENDORTH J. ; SCHEIBER P.**

Séroépidémiologie de l'infection streptococcique (ACG) à propos de 435 recherches d'antistreptolysines

Bull. Soc. Med. Afr. noir 1972

**67-STREFF K. ; JEAN PIERRE H. ; DARBAS H. ; PAILLISSON J.**

Entérocoques au C.H.U. de Mont Pelier en sept 1993 :

**68-STOSOR V. ; NOSKIN G. A. ; PETERSON L. R.**

The management and prevention of VRE

Infect. Med. 1996.

**69-SIGLER A. J. ; HESSEN M. T.**

Antibiotic resistance in clinically important Gram positive cocci

Infect. Med. 1993

**70-SY K. R.**

Souches bactériennes et résistance aux antibiotiques : données actuelles  
au C.H.U. Le Dantec

Thèse Pharm., Dakar, 1996, n°61

**71-SHARON L. H. ; PATRICIA K. F.**

concurrent comparability of automated system and commercially prepared  
Microdilution trays for susceptibility testing

J. Clin. Microbiol., 1993,17 (5) : 878-886

**72-TOMAS Z. A.**

Multiple Antibiotic resistant pathogenic bacteria : a report on the rock feller  
university work shop

N. Engl. J. Med. 1994 ; 330 : 1247-50

**73-TRAORE H.**

Sérogroupe et sensibilité aux antibiotiques des Streptocoques  
hémolytiques au C.H.U. de Dakar  
Thèse Pharm, Dakar, 1977, n°47

## Liste des abréviations

<b>URE</b>	:urée
<b>ADH</b>	:arginine dihydrolase
<b>ODC</b>	:ornithine décarboxylase
<b>VP</b>	: voges-proskauer
<b>ONPG</b>	: orthonitrophényl B-D galactopyranoside
<b>NIT</b>	: nitrate
<b>GLU</b>	: glucose
<b>TRE</b>	: tréhalose
<b>MAN</b>	: mannitol
<b>XYL</b>	: xylose
<b>SAC</b>	: saccharose
<b>GLY</b>	: glycérol
<b>MNE</b>	: mannose
<b>LAC</b>	: lactose
<b>RAF</b>	: raffinose
<b>ESC</b>	: esculine
<b>BHS</b>	: bouillon hypersalé
<b>ARA</b>	: arabinose
<b>SOR</b>	: sorbitol
<b>SOS</b>	: sorbose
<b>INU</b>	: inuline
<b>RIB</b>	: ribose
<b>AMD</b>	: amidon
<b>MH</b>	: muëller-hinton