

# **INTRODUCTION**

*Haemophilus influenzae* occupe une place importante en pathologie infectieuse. Il fait partie de la triade bactérienne classique des agents étiologiques des méningites bactériennes et représente également un agent majoritaire des otites moyennes, mais aussi des pneumopathies communautaires chez les patients séropositifs.

Raison pour laquelle il est important de toujours le rechercher, l'identifier et étudier sa sensibilité aux antibiotiques pour faciliter le traitement des infections dont il est la cause. Ainsi l'antibiogramme de la souche bactérienne isolée va nous permettre de mettre en œuvre une antibiothérapie efficace qui facilitera le choix de l'antibiotique le plus actif.

Cependant du fait de la nécessité d'une antibiothérapie rigoureusement bactéricide lors des infections graves comme les septicémies, les méningites, il devient important d'étudier la CMB et classer ainsi les  $\beta$ -lactamines suivant leur pouvoir bactéricide ou bactériostatique.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude qui, outre la CMI vise à déterminer la CMB qui permettra de connaître l'effet bactéricide ou bactériostatique des antibiotiques souvent utilisés au CHU Aristide Le DANTEC.

L'étude porte sur un germe très exigeant, *Haemophilus influenzae*, isolé sur des malades du CHU Aristide Le DANTEC.

Plusieurs méthodes ont été utilisées :

- Diffusion en milieu gélosé : E-test (CMI)
- Dilution en milieu gélosé (CMI)
- Dilution en milieu liquide sur microplaque (CMI/CMB)

Après quelques rappels bibliographiques relatifs au germe *Haemophilus influenzae*, aux  $\beta$ -lactamines et à leurs effets bactériostatique et bactéricide, nous exposerons les matériels et méthodes utilisés avant de finir sur l'analyse et la discussion de nos les résultats.

**PREMIERE PARTIE :**  
**GENERALITES**

## 1. HISTORIQUE ET EVOLUTION DU GERME *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

*Haemophilus influenzae* avait été observé dans l'exsudat de conjonctivites purulentes par Koch en 1883 en Egypte puis en 1886 aux USA par WEEKS et signalé dans un traité de 1889 sous le nom de *Bacillus aegyptius*.

Au cours de la pandémie de grippe de 1889 à 1892, PFEIFFER a observé et cultivé à partir de crachats de grippe un bacille, *Bacillus influenzae* et en a fait l'agent étiologique de la grippe ; il a montré la présence indispensable de sang pour la culture de cette bactérie et invente la gélose au sang. Le nom du germe *Haemophilus* a été proposé en 1917.

En 1939, A. LWOFF propose le démembrement des «*Haemophilae* » et la création du genre *Moraxella*, suivi en 1952 par MORENO-LOPEZ qui propose le genre *Bordetella*.

En 1930, PITTMAN met en évidence l'existence de souches capsulées, propose des types sérologiques et montre la prédominance du type b dans les méningites et autres infections aiguës suppurées (5).

## 2. TAXONOMIE ET NOMENCLATURE

Le genre *Haemophilus* est placé dans la famille des Pasteurellose avec les germes *Pasteurella* et *Actinobacillus*.

*Haemophilus influenzae* est l'espèce type du genre qui contient seize espèces d'origine animale et humaine (8).

➤ **Les espèces exigeant les facteurs X et V**

- *Haemophilus influenzae*,
- *Haemophilus aegyptius*,
- *Haemophilus haemolyticus*.

➤ **Les espèces exigeant les facteurs X :**

- *Haemophilus haemoglobinophilus*,
- *Haemophilus ducreyi*.

➤ **Les espèces exigeant les facteurs V**

- *Haemophilus parainfluenzae*,
- *Haemophilus paraticamolyticus*,
- *Haemophilus pleuropneumoniae*,
- *Haemophilus paracuniculus*,
- *Haemophilus segnis*,
- *Haemophilus parasuis*,
- *Haemophilus paragallinarium*,
- *Haemophilus airum*.

*Haemophilus aphrophilus* présente une exigence en facteur X variable.

### **3. CARACTERES GENERAUX DU GERME**

#### **3.1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES**

*Haemophilus unfluenzae* est un bacille à Gram négatif, immobile, de petite taille ( 0.5 à 2.4µm X 0.2µm ), polymorphe, souvent coccobacillaire, prenant parfois une structure filamenteuse, notamment dans les cas de carence en facteur de croissance. Certaines souches peuvent présenter une capsule qui accroît leur virulence ou des fimbriae qui leur confèrent des propriétés hémagglutinantes.

### **3.2. CARACTERES CULTURAUX**

*Haemophilus influenzae* ne peut pousser que sur des milieux de culture enrichis en sang, lequel apporte les deux facteurs que sont l'hémine (ou facteur X) et le NAD (nicotinamide adénine dinucléotide ou facteur V). Cette double exigence permet de le distinguer d'autres espèces et notamment *Haemophilus parainfluenzae* qui ne nécessite que du NAD. Cependant comme le sang frais contient également des inhibiteurs du facteur V, il est nécessaire d'utiliser des milieux d'isolement au sang cuit (15 min à 75-80°C). A l'inverse, un chauffage excessif détruit le NAD. Il est donc important de s'assurer de la qualité des milieux de cultures pour *Haemophilus*.

En anaérobiose, la croissance d'*H. influenzae* n'est pas dépendante de l'Hémine, ce qui peut être source de difficultés d'identification. L'exigence en NAD, peut être recherchée sur des milieux additionnés de NAD purifié, ou par la mise en évidence d'un satellitisme d'*H. influenzae* autour des colonies de *staphylococcus aureus* ( qui produisent du NAD ). Après 24 h de culture à 37°C sur gélose-chocolat, *H. influenzae* donne des colonies « smooth », convexes, grisâtres, translucides, de 0.5 à 1 mm. Les souches encapsulées donnent des colonies mucoïdes de plus grosse taille, iridescentes et transilluminantes obliques.

Certaines espèces nécessitent pour leur croissance une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.

### **3.3. CARACTERES BIOCHIMIQUES**

Huit biotypes ( I à VIII ) ont été définis pour l'espèce *H. influenzae* à partir des caractères métaboliques suivants : production d'indole, activités enzymatiques uréase et ornithine décarboxylase (46). Le biotype I est plus fréquemment retrouvé dans les méningites et le biotype IV dans les infections génitales (11).

### **3.4. CARACTERES ANTIGENIQUES :( figure 1)**

#### **– Capsule**

Six variétés antigéniques (a, b, c, d, e, f ) ont été décrites par PITTMAN (61) en fonction de la structure antigénique du germe. La spécificité de type dépend de la composition en polysaccharides de la capsule. Différents sucres ont été individualisés : glucose, ribose, ribitol, galactose, acide mannuronique.

Seul le polysaccharide de type b, constitué de polyribosyl ribitol phosphate ou PRP a une structure composée de deux riboses. L'association fréquente entre sérotype b et biotype I semble être une conséquence de la diversité génétique limitée ( clonalité ) des *H. influenzae* de type b (51). La grande majorité des pathologies invasives chez l'enfant (méningites, épiglottites, arthrites, septicémies ) est due aux souches capsulées de type b en raison du rôle majeur du PRP comme facteur de virulence. Cette plus grande virulence du type b est attribuée à sa forte résistance à l'activité du complément qui permet une survie prolongée et une multiplication des germes dans le sang (66). Le PRP est antigénique, obtenu sous forme purifiée et couplée à une protéine le rendant lymphocyte T dépendant, il est utilisé dans le vaccin anti-*Haemophilus b* (39).

#### **– Membrane externe**

Comme tous les bacilles à Gram négatif, *H. influenzae* possède une membrane externe constituée de protéines, de porines, de phospholipides et de lipo-oligosaccharides (LOS) (51). Les LOS sont constitués de Lipide A, de 2 céto-3 désoxyoctonate (KDO) et d'oligosaccharides (25). Ces oligosaccharides de faible poids moléculaire sont constitués de monosaccharides (glucose, galactose, glucosamine, heptose), d'éthanolamine et de phosphate (25). Les profils électrophorétiques des LOS permettent de

définir des sous-types utilisables dans les études épidémiologiques. L'activité endotoxinique est liée à la portion lipidique A dont la structure est proche de celle du lipide A du lipopolysaccharide (LPS) des entérobactéries .C'est la lyse des LOS avec libération de lipide A qui est responsable du choc septique à *H. influenzae* (51).

Les protéines de membranes externes (PEM), très immunogènes, représentent des facteurs de virulence chez les souches d'*H. influenzae* en particulier celles non capsulées, avec une très grande hétérogénéité de ces protéines. Le sérotypage de ces protéines est utile en épidémiologie (74).

Ces protéines sont les constituants antigéniques moyens des antigènes de surface. Il existe une très grande hétérogénéité des protéines de membrane externe des souches d'*H. influenzae* non typables par rapport aux *H. influenzae* de sérotype b .

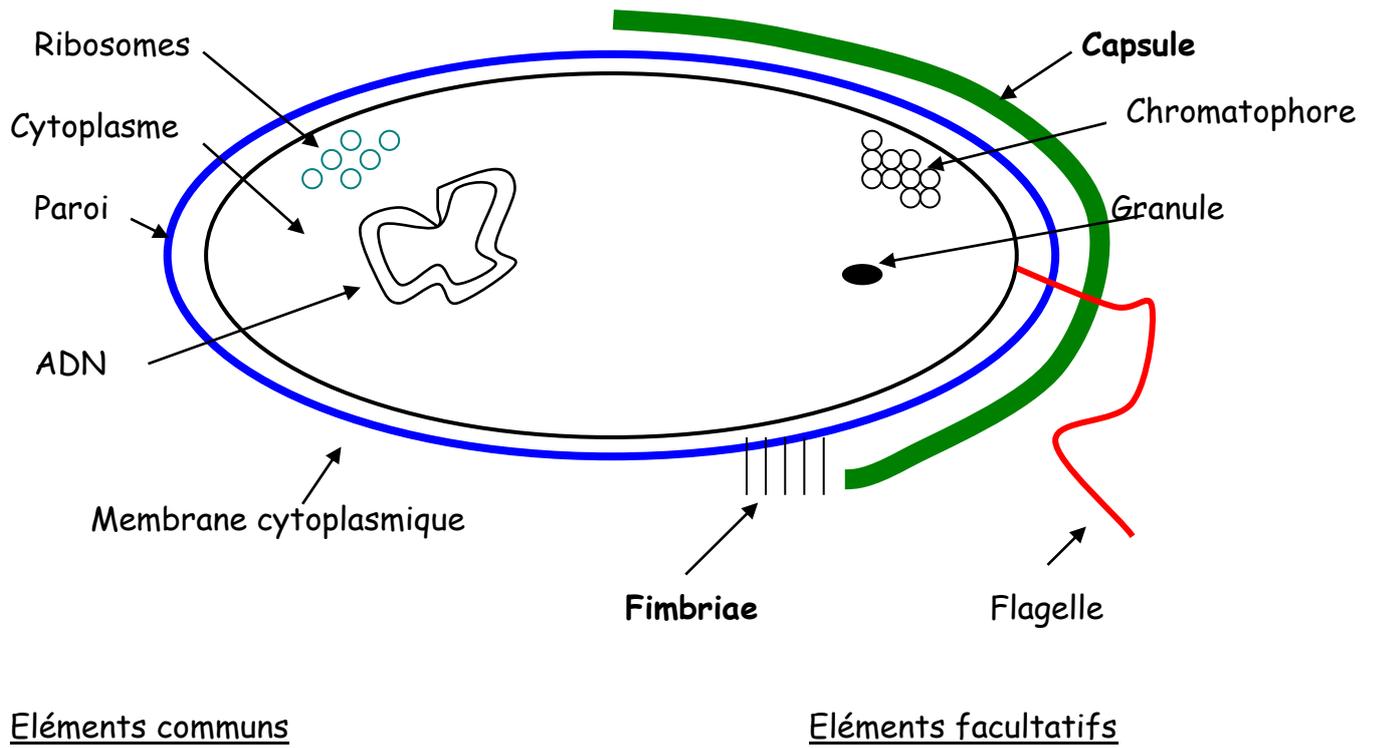
#### – Pili ou fimbriae

La présence de pili ou fimbriae, mise en évidence chez *H. influenzae*, confère à la bactérie des propriétés d'adhésion à la muqueuse nasopharyngée, étape précédant l'invasion sanguine et méningée.

Leur rôle n'apparaît pas obligatoirement dans la colonisation de la muqueuse ni dans la phase d'invasion ultérieure s'accompagnant de la perte de pili. Les pili interviendraient dans la phase initiale de la colonisation par extinction au travers de la capsule polysaccharidique de type b. Cette adhésion est de faible affinité et la persistance de la colonisation serait liée à la présence de fibrilles, ayant une structure différente de celle des pili (67) .

Chez *H. influenzae type b*, la piliation permet de définir cinq sérotypes sur la base de différences d'antigénicité de la molécule de piline. Pour *H. influenzae type b*, les souches isolées du LCR et du sang sont le plus souvent non piliées contrairement à celles isolées du rhinopharynx (52) .

La piliation des souches non typables est plus polymorphe.



**FIGURE 1 : Cellule bactérienne (50)**

#### **4. HAEMOPHILUS INFLUENZAE ET ANTIBIOTIQUES**

*Haemophilus influenzae* est une espèce naturellement sensible à de nombreux antibiotiques : Bêta-lactamines, aminosides, tétracyclines, Chloramphénicol, rifampicine, quinolones, triméthoprime.

##### **4.1. RESISTANCE NATURELLE ET RESISTANCE ACQUISE**

La résistance naturelle est une caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne. La résistance acquise ne s'applique qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne. Elle est due à une modification génétique (mutation ou apport de matériel génétique étranger).

##### **4.2. MECANISMES DE RESISTANCE : ( 3, 50, 53, 63 )**

Les mécanismes de résistance décrits actuellement peuvent être classés en trois catégories.

###### **4.2.1. Résistance par synthèse d'enzymes inactivant l'ATB**

Ce mode de résistance implique l'inactivation de l'antibiotique par un enzyme bactérien. C'est l'exemple des  $\beta$ -lactamases, enzymes produits par certaines bactéries, capables d'inhiber les  $\beta$ -lactamines par hydrolyse de leur cycle  $\beta$ -lactame. Les  $\beta$ -lactamases sont le plus souvent codées par les plasmides. Les plus grands producteurs de  $\beta$ -lactamases sont les staphylocoques mais aussi les Gram négatifs.

Ce type de résistance concerne également les aminosides qui peuvent être inactivées par des enzymes bactériens tels que, les N-acétyltransférases, les O-nucléotidases et les O-phosphorylases.

L'érythromycine estérase produite par *Escherichia coli*, inactive le cycle lactame de l'érythromycine. Cependant, ce mode de résistance plasmidique est assez rare.

#### **4.2.2. Résistance par modification de la cible de l'Antibiotique**

Pour être actifs, les antibiotiques doivent se fixer sur leurs cibles mais suite à une modification de ces cibles, certaines bactéries peuvent devenir insensibles à l'action des antibiotiques. Les antibiotiques inhibiteurs d'enzymes sont rendus inactifs lorsqu'une mutation de l'enzyme-cible en empêche leur liaison. Ainsi la résistance aux fluoroquinolones peut être due à une mutation de l'ADN gyrase qui empêche la formation du complexe ternaire à fluoroquinolone gyrase-ADN. Ce mode de résistance est décrit pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, les entérobactéries et les bactéries Gram positifs. La résistance aux bêta-lactamines peut être liée à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PLP suite à une mutation de celles-ci.

#### **4.2.3. Résistance par diminution de la perméabilité bactérienne**

La membrane externe des Gram négatifs peut constituer une barrière à la pénétration des antibiotiques. A travers cette membrane, de petits canaux aqueux appelés porines permettent le passage de petites molécules hydrophiles. Ainsi des molécules d'antibiotiques trop volumineuses ou insuffisamment hydrophiles ne pourront emprunter cette voie d'accès ne pénétrant que modestement dans les bactéries. Toute mutation affectant une porine va perturber la pénétration de l'antibiotique dont elle permet le passage.

L'antibiotique au sein de la bactérie peut être aussi expulsé vers l'extérieur par un système de pompes actives localisées sur la membrane interne. Le phénomène connu sous le nom d'efflux actif a été décrit pour les fluoroquinolones, les tétracyclines et les macrolides. Ces mécanismes sont responsables des deux types de résistance cités plus haut (naturelle et acquise).

### **4.3. MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES** **D'H. INFLUENZAE**

#### **4.3.1. Résistance à l'ampicilline**

Les  $\beta$ -lactamines représentent la thérapeutique de référence, et jusqu'au début des années 1970 le traitement des infections reposait sur l'ampicilline. Depuis, on note l'apparition de souches résistantes à l'ampicilline par production de  $\beta$ -lactamases (73).

Il s'agit d'une enzyme de type TEM1, plasmidique. Sur le même plasmide est parfois associée une résistance à différents antibiotiques, en particulier : Kanamycine, tétracycline, sulfamides, triméthoprim, Chloramphénicol.

En France, 55% des souches de type b et 24% des souches non typables sont productrices de  $\beta$ -lactamases (26). La production de  $\beta$ -lactamases confère une résistance aux amino-, carboxy- et ureidopenicillines. Les souches restent néanmoins sensibles aux céphalosporines de 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> générations et aux carbapénèmes. L'activité de l'amoxicilline est restaurée par l'association avec des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique.

#### **4.3.2. Résistance à l'Amoxicilline**

Dans les années 1980, sont apparues des souches résistantes à l'amoxicilline mais non productives de  $\beta$ -lactamases. Cette résistance peut être due à une altération d'origine chromosomique des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) ou à une diminution de la perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques. Ces deux modes de résistance sont beaucoup plus rares que la production de  $\beta$ -lactamases (26).

### **4.2.3. Résistance au chloramphénicol**

Elle est liée à la production d'une chloramphénicol acétyl-transférase d'origine plasmidique. Il existe des souches invasives multirésistantes à l'ampicilline et au chloramphénicol (8).

### **4.2.4. Résistance multiple aux antibiotiques**

Certaines souches *H. influenzae* peuvent être résistantes conjointement à plusieurs antibiotiques. Le mécanisme de ces résistances est le plus souvent plasmidique. Le plasmide peut être entièrement intégré au génome bactérien et devient ainsi indétectable (66).

De nombreux phénotypes de résistance multiple ont été décrits en fonction de différentes associations de résistance .

Ces souches multirésistantes restent relativement rares, en dehors d'exceptionnels foyers de résistance multiple (11).

## **5. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE DES INFECTIONS**

### **A H. INFLUENZAE**

#### **5.1. PRELEVEMENT**

*H. influenzae* peut être isolé de prélèvements mono microbiens ou normalement stériles, comme les hémocultures, le liquide céphalorachidien, le liquide pleural mais aussi de prélèvements poly microbiens contaminés par la flore commensale dont il fait lui-même partie ( prélèvements nasopharyngés ). Dans ce dernier cas, sa prédominance associée à une importante réaction leucocytaire, permet une première orientation quant à son rôle pathogène.

## **5.2. EXAMEN DIRECT**

Dans un produit pathologique ou dans une culture, *H. influenzae* se présente comme un petit bacille à Gram négatif, le plus souvent cocobacillaire, immobile, non sporulé et, dans certains cas, possédant une capsule.

L'examen direct est utile pour les produits mono microbiens et lors de méningite, l'aspect cocobacillaire et le polymorphisme sont de bons éléments d'orientation. La lecture est plus difficile dans les produits souvent poly-microbiens comme les expectorations, les éléments à rechercher sont l'abondance de coco bacilles ou de bacilles fins accompagnant le polymorphisme et les polynucléaires.

## **5.3. CULTURE**

L'appartenance au genre *Haemophilus* repose sur l'exigence en facteur X et V. Les milieux de culture utilisés doivent apporter ces deux facteurs : gélose au sang cuit et gélose chocolat supplémentées par un complexe poly vitaminé, milieux nutritifs habituels supplémentés en facteurs X et V. Dans les produits poly-microbiens la recherche de *H. influenzae* se fera sur milieux sélectifs obtenus par addition de bacitracine (50 mg/ml).

L'incubation se fera en atmosphère enrichie au CO<sub>2</sub> ( 5 à 7%) à 35-37° C.

## **5.4. IDENTIFICATION**

L'identification est basée sur l'exigence des *Haemophilus* en sang ou facteurs sanguins d'ou l'utilisation de milieux enrichis.

La première étape de l'identification consiste donc en la mise en évidence de l'exigence en facteur X et/ou V par :

- le phénomène de satellitisme ;
- l'utilisation d'une gélose ordinaire à laquelle on ajoutera les facteurs sous forme de disques déposés à la surface de la gélose.

L'identification est complétée par l'étude des caractères biochimiques, l'examen microscopique des colonies, le polymorphisme et le sérotypage.

### **5.5. DIAGNOSTIC RAPIDE**

Le diagnostic rapide repose sur la recherche d'antigènes polysaccharidiques ( antigènes solubles ) dans les liquides biologiques. Cette recherche est réalisée par différentes techniques telles que l'électrophorèse, l'agglutination de particules de latex sensibilisées par les anticorps et l'ELISA. Elles permettent un diagnostic rapide de l'infection avant la confirmation par la culture.

## **6. LES BÊTA-LACTAMINES**

Ce sont des antibiotiques bactéricides divisés en deux groupes, les pénicillines et les céphalosporines. Les pénicillines comprennent les pénicillines naturelles du groupe G et V et les pénicillines d'origine synthétique ou hémisynthétique (l'oxacilline utilisée dans les infections dues aux staphylocoques, l'ampicilline et l'amoxicilline parfois associée à un inhibiteur de  $\beta$ -lactamases, les carboxypénicillines et les ureidopénicillines). Les céphalosporines appartiennent à trois générations, mais seules les céphalosporines de troisième génération comme le céfotaxime, le céftriaxone, le céfixime sont utilisés dans les méningites à germes sensibles.

En effet, les céphalosporines de première et de deuxième génération ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique et n'ont donc aucune efficacité dans les méningites. Les  $\beta$ -lactamines sont des antibiotiques très bien tolérés même si des réactions allergiques peuvent survenir lors de leur utilisation.

### **6.1. CLASSIFICATION : (3, 9, 13)**

C'est l'une des familles d'antibiotiques les plus prolifiques. Elles contiennent dans leur structure un noyau  $\beta$ -lactame responsable de l'activité antibactérienne.

On distingue trois familles :

- les pénicillines
- les céphalosporines
- les monobactams

- **Les pénicillines**

Leur structure comprend un cycle  $\beta$ -lactame accolé à un thiazolidine. Selon la nature des substituants greffés à ce noyau, on distinguera dans ce groupe entre autres :

- Les pénicillines naturelles (groupes G et V) ;
- Les pénicillines du groupe A (aminopénicillines) avec l'amoxicilline et l'ampicilline ;
- Les pénicillines du groupe M (isooxazolyl pénicillines) telles que l'oxacilline et la flucloxacilline ;
- Les carboxypénicillines avec la carbenicilline et la ticarcilline ;
- Les acylureidopénicillines (pipéracilline, azlocilline, mezlocilline) ;
- Les amidinopénicillines (pivmécillinam).

- **Les céphalosporines**

Les céphalosporines ont pour noyau commun l'acide 7-amino céphalosporanique. Leur classification repose d'avantage sur leur spectre d'action de plus en plus large que sur une structure chimique commune. On les répertorie de façon quelque peu arbitraire en générations successives :

- 1<sup>ère</sup> génération : céfadroxil, céfaloridine, céfalotine, céfaprine, céfazoline, céfalexine ;
- 2<sup>ème</sup> génération : céfamandole, céfatrizine, céfuroxime, céfotiam, céfoxitine, céfaclor, céforadine ;
- 3<sup>ème</sup> génération : céfotaxime, céftriaxone, céfopérazone, latamoxef, céftazidine, céfsulozine, céfotétan, céfixime ;
- 4<sup>ème</sup> génération : céfépime, céfpirome.

Remarque : les inhibiteurs spécifiques et irréversibles des  $\beta$ -lactamases tels que l'acide clavulanique n'ont pas en eux-mêmes une activité antibiotique intéressante ; ce sont de mauvais antibiotiques.

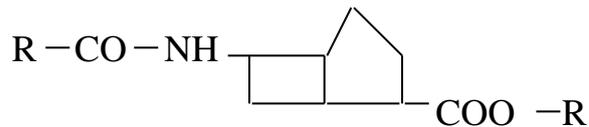
Mais leur association à d'autres antibiotiques en particulier les  $\beta$ -lactamines (ex : Amoxicilline) restaure à celles-ci leurs propriétés.

Plusieurs composés ont fait l'objet de publications :

- l'Acide clavulanique isolé de *Streptomyces clavuligerus*.
- Association Acide clavulanique et Amoxicilline

## **6.2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES**

- Le cycle  $\beta$ -lactame est nécessaire à l'activité de la molécule
- Son ouverture par les  $\beta$ -lactamases bactériennes (céphalosporinases, pénicillinases) rend la molécule inactive.
- La nature de la chaîne latérale « R » détermine les propriétés biologiques :



- Spectre d'action
- Résistance au pH acide (administration per os)
- Protection contre l'hydrolyse enzymatique du cycle  $\beta$ -lactame
  - La nature du radical « R » donne les sels ou les esters de l'antibiotique et conditionne la solubilité et la résorption de celui-ci.

### **6.3. MODE D'ACTION DES BETA-LACTAMINES : (12,56)**

L'activité anti-bactérienne d'une  $\beta$ -lactamine résulte de plusieurs phénomènes notamment :

- la pénétration dans la bactérie et son accessibilité à la cible létale (protéine cible de la membrane cytoplasmique),
- son affinité à cette cible,
- son pouvoir inducteur de céphalosporinases généralement inductibles,
- son comportement lorsque la céphalosporinase est constitutive.

Pour les céphalosporines, plus elles sont stables vis à vis des  $\beta$ -lactamases, plus elles ont de la peine à pénétrer jusqu'aux protéines cibles.

Les  $\beta$ -lactamines manifestent un pouvoir bactéricide sur les bactéries sensibles en agissant au niveau de la synthèse de leur paroi.

En effet la culture d'une bactérie en présence d'une  $\beta$ -lactamine peut dans certains cas entraîner l'accumulation d'un nucléotide d'uridine, précurseur du mucopeptide de la paroi.

Dans d'autres cas, les mêmes conditions de culture peuvent entraîner la formation de protoplastes (bactéries dépourvues de paroi).

Par ailleurs, les bactéries sans paroi et les mucoplasmes sont insensibles à l'action de la pénicilline, de même que les bactéries au repos.

Sur le plan morphologique, l'effet des  $\beta$ -lactamines sur les bactéries est variable :

- formation de formes filamenteuses avec lyse tardive,
- formation de sphéroplastés avec lyse précoce,
- apparition de formes arrondies, globuleuses, osmotiquement stables avec lyse bactérienne tardive.

Les travaux actuels montrent que ces différents comportements morphologiques correspondent à une fixation différente des  $\beta$ -lactamines sur les protéines-cibles réceptrices.

Cela confirme la présence des récepteurs spécifiques que sont les PLP ou protéines de liaison aux pénicillines. Les PLP (**56**) sont situées sur la membrane interne cytoplasmique de la paroi bactérienne.

Il existe actuellement 11 PLP distinctes fixant de façon irréversible la  $\beta$ -lactamine par une réaction covalente. A des concentrations faibles, inférieures à la CMI de la bactérie, chaque  $\beta$ -lactamine possède une affinité préférentielle différente vis à vis de chacune des PLP.

L'augmentation de concentration de l'antibiotique permet de fixer d'autres PLP.

Cette fixation sur les différentes PLP se traduit par des modifications de l'élongation, de la forme et de la division bactérienne.

### **6.3. 1. Les pénicillines du groupe A**

Ces antibiotiques constituent le groupe des pénicillines à large spectre, dont l'activité s'étend en principe aux bacilles à gram négatif.

#### **6.3.1.1. Ampicilline**

C'est la première pénicilline à large spectre introduite en 1961.

### **6.3.1.1.1. Propriétés physiques**

Poudre blanche, hygroscopique, facilement soluble dans l'eau, assez soluble dans l'acétone, pratiquement insoluble dans l'éther, dans les huiles grasses et dans la paraffine liquide.

### **6.3.1.1.2. Activité antibactérienne**

- **Mode d'action**

Comme toutes les  $\beta$ -lactamines, l'Ampicilline exerce un effet bactéricide en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. Cet effet est secondaire à la fonction de l'Ampicilline sur des protéines réceptrices : les Protéines de liaison aux Pénicillines ou PLP (12).

L'Ampicilline est inactivée par la pénicillinase staphylococcique et par les  $\beta$ -lactamases secrétées entre autre par certaines bactéries à gram négatif.

- **Spectre d'activité**

En ce qui concerne les cocci gram positif et gram négatif, l'Ampicilline n'apporte pas d'avantages décisifs par rapport à la penicilline G. De plus, elle est détruite par la pénicillinase staphylococcique. La sensibilité des Entérocoques est souvent limitée. Cependant, la CMI est parfois plus basse que pour la pénicilline G (CMI  $\leq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ ).

→ Les bacilles gram positif et notamment *Listeria monocytogènes* sont sensibles, avec une activité voisine de celle de la pénicilline G.

→ L'intérêt de l'Ampicilline réside dans son activité bactéricide sur de nombreux bacilles gram négatif en particulier : *Haemophilus influenzae*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Brucella*, *Proteus mirabilis*.

Par contre d'autres germes fréquents en milieu hospitalier échappent à son action ; en effet ces bactéries sécrètent une  $\beta$ -lactamase qui inactive l'Ampicilline ; c'est le cas pour certaines souches d'*Haemophilus influenzae*.

### 6.3.1.2. Amoxicilline : (65, 68)

C'est une pénicilline hémi-synthétique dont les propriétés se rapprochent de celles de l'Ampicilline.

#### 6.3.1.2.1. Propriétés physiques

Poudre blanche très hygroscopique, elle est soluble dans l'eau, assez soluble dans l'éthanol et très peu dans l'acétone. Elle est pratiquement insoluble dans l'éther.

#### 6.3. 1.2.2. Activité antibactérienne

- **Mode d'action**

Il est comparable à celui de l'Ampicilline. Cependant la bactéricidie est plus rapide (47). L'activité de l'amoxicilline sur la bactérie résulterait d'une inhibition d'une transpeptidase en un site différent de celui de l'Ampicilline.

Ainsi l'amoxicilline est responsable d'une lyse d'emblée de la bactérie sans précession par des formations filamenteuses tout à fait viables.

- **Spectre d'activité : (60)**

Espèces habituellement sensibles (CMI $\leq$  4mg/l) :

*Streptocoques A, B, C, F, G non groupables ; pneumonie peni S, E. faecalis, L. monocytogenes ; C. diphtheriae, R. rhusopathiae, Eikenella, N. meningitidis.*

Espèces modérément sensibles : *E. faecalis.*

Espèces inconstamment sensibles : *N. gonorrhoeae, H. Influenzae, E. coli, Salmonella, shigella, V. cholerae, P. mirabilis*

Espèces résistantes : *E. faecium, Staphylocoques, S. pneumonie péni I ou R, Klebsiella, C. diversus, Pseudomonas aeruginosa, S. maltophilia, mycobactéries....*

### **6.3.2. Les pénicillines du groupe G**

Ce groupe comprend la pénicilline G, ses sels, ses formes retard et les phénoxy-pénicillines dont le chef de file est la Pénicilline V.

Les Pénicillines de ce groupe sont inactivées par la pénicillinase des staphylocoques et des bacilles gram négatifs qui la produisent.

Leur spectre comprend les cocci Gram positif, les cocci Gram négatif, les bacilles gram positif.

### **6.3.3. Les pénicillines du groupe M**

Ce groupe comprend les pénicillines résistantes à la pénicillinase du staphylocoque.

Méthicilline et isoxazolyl-pénicillines.

Leur spectre est étroit et la seule indication reste le staphylocoque producteur de cette pénicillinase.

### **6.3.4. Les céphalosporines de première génération**

Elles ont toutes à quelques nuances près le même spectre d'activité et la même diffusion. Elles ne se différencient que par les propriétés pharmacocinétiques et la voie d'apport .

Le spectre est celui des pénicillines M et A avec une activité intrinsèque de l'ordre de 2 à 8 µg/ml sur les souches d'entérobactéries sensibles.

Cependant ces céphalosporines résistent mal à l'action des β-lactamases des bacilles gram négatif et restent inactives sur les Enterobactéries, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* indole positif, *Providencia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella*.

Les avantages par rapport à l'ampicilline se situent à l'égard des *klebsiella* toujours résistantes à l'ampicilline et à l'égard des souches d'*Escherichia coli* et *proteus mirabolis* productives de pénicillinases

### **6.3.4.1. Cefadroxil**

C'est une Céphalosporine hémi-synthétique active par voie orale.

#### **6.3.4.1.1 Propriétés physiques**

Poudre blanche à sensiblement blanche, peu soluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool, pratiquement insoluble dans l'éther.

#### **6.3.4.1.2. Activité Antibactérienne**

- **Mode d'action**

Comme les pénicillines, les céphalosporines exercent un effet bactéricide par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.

Cette action est secondaire à la liaison de la céphalosporine à des protéines cibles, les Protéines de liaison aux Pénicillines ou PLP.

Le céfadroxil comme les autres céphalosporines dites de 1<sup>ière</sup> génération est stable vis à vis des pénicillinases staphylococciques et de certaines souches d'enterobactéries (*Escherichia coli* ampi-résistants, *Proteus mirabilis* ampi-résistants, *klebsiella*).

Par contre, elle est hydrolysée par les céphalosporinases produites par la plupart des bacilles gram négatif et notamment les entérobactéries.

- **Spectre d'activité**

Le céfadroxil est actif à la fois sur les espèces gram positif et négatif, avec un spectre apparemment large.

- Comme les pénicillines M, le céfadroxil est actif sur 80% des staphylocoques. Les 20% restant concernent la « Résistance hétérogène » croisée entre pénicilline M et céphalosporine. Le céfadroxil, comme nous l'avons vu plus haut, est stable vis à vis de pénicillinases sécrétées par plus de 85% des souches de staphylocoque.

- Sur les streptocoques A, B, et le pneumocoque, le céfadroxil comme les autres céphalosporines est moins actif que la pénicilline G. Les staphylocoques du groupe D sont en général résistants.

- Les *Neisseria* (méningocoques et gonocoques) sont sensibles.

Le Céfadroxil est régulièrement plus efficace que les Pénicillines A sur certains bacilles Gram négatifs sécréteurs de pénicillinases *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*. De même pour les *Klebsiella* régulièrement résistantes à l'Ampicilline. Par contre le céfadroxil est inefficace sur les autres entérobactéries sécrétrices de  $\beta$ -lactamases : *Enterobactérie*, *Serratia*, *Providencia*, *Acinetobacter*, *Proteus* indole positif.

De même il est inactif sur le Pyocyanique.

Les *Haemophilus* sont inconstamment sensibles.

Les bactéries anaérobies sont le plus souvent résistantes.

Les Tréponèmes sont le plus souvent sensibles.

#### **6.3.4.2. Autres**

Il s'agit de produits inactifs par voie orale : céfalotine, céfacétil, céfapirine, céfaloridine, céfazoline.

#### **6.3.5. Les céphalosporines dites de 2<sup>ème</sup> génération**

Il s'agit de céphalosporines résistantes partiellement ou totalement aux  $\beta$ -lactamases.

Dans ce groupe on retrouve le céfaclor, la céfatrizine et le céfoxitine. Ce dernier est une céfamycine mais son mode d'action et son spectre d'activité le font assimiler aux céphalosporines.

Ces molécules associent à la fois une grande stabilité vis à vis des  $\beta$ -lactamases et une activité in vitro plus importante.

Ces antibiotiques sont donc légèrement plus actifs que ceux de la « première génération » sur les souches d'entérobactéries sensibles.

Mais ces 3 antibiotiques ont d'importantes insuffisances que partagent deux composés récents, le céfonocide (proche du céfamandole) et le céfmédazole (plus actif que la céfoxitine).

### 6.3.5.1. Céfaclor

#### 6.3.5.1.1. Propriétés physico-chimique

Poudre blanche ou sensiblement blanche, assez soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans le chlorure de méthylène et dans le méthanol.

#### 6.3.5.1.2. Activités antibactérienne

- **Mode d'action**

Le céfaclor modifie la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant aux PLP (essentiellement 1 et 2), son affinité pour la PLP 3 étant plus faible que celles des autres  $\beta$ -lactamines. Son activité n'est pas influencée par l'inoculum contrairement aux autres  $\beta$ -lactamines .

Il existe un effet post antibiotique sur les bactéries à Gram négatif.

- **Spectre d'activité**

Espèces habituellement sensibles

Streptocoques A , C, G, F

*Streptocoques B*

*Streptocoques non groupables* ,*S. pneumoniae* *peni S*, *Neiseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, ***H. influenzae***  $\beta$ -*lactamase* + *et -*, *M.catarhalis*, *N. gonorrhoeae*, *E.coli*, *Pasteurella*, *Salmonella*, *Shigella*, *P. mirabilis* .

Espèces modérément sensibles : *Staphylocoque meti R*, *C. diversus* *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. acnes*.

Espèces inconstamment sensibles : *S. pneumoniae peni I ou meti R*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *Fusobacterium*.

Espèces résistantes : *enterobacter*, *Staphylocoques méti-R*, *L. monocytogenes*, *Enterobacter*, *Serratia*, *C. freundii*, *M. morgani*, *Pseudomonas sp*, *Acinobacter*, autres *BGN non fermentants*, *B. fragilis*, *Clostridium sp*, *Peptostreptococcus*,

### 6.3.5. 2. LA CEFATRIZINE

#### 6.3.5.2.1. Propriétés physiques

Poudre blanche, peu soluble dans l'eau, pratiquement insoluble dans le méthanol, soluble seulement dans un mélange à volume égal de phosphate pH 6 et d' eau distillée stérile.

#### 6.3.5.2.2. Activité antibactérienne

- **Mode d'action :**

Comme toutes les  $\beta$ -lactamines la céfatrizine possède une activité de type bactéricide. Cette bactéricidie résulte de l'impossibilité de la bactérie de synthétiser une paroi normale. Il en résulte, une fragilité vis à vis des gradients osmotiques transpariétaux.

Cette altération de la synthèse de la paroi passe par une fixation de la céfatrizine à des protéines réceptrices, les PLP.

- **Spectre d'activité**

Espèces habituellement sensibles : *Staphylocoques méti S*, *Streptocoques*, *S. pneumoniae péni S*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *Neisseria*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani*, *Providencia*, *C. diversus*, *Serratia*, *Entétobacter*.

Espèces modérément sensibles : *P. aeruginosa*

Espèces inconstamment sensibles : *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae I* ou *R*.

Espèces résistantes : *Enterocoques*, *Listeria*, *Staphylocoques méti R*.

### **6.3.6. Les céphalosporines dites de 3<sup>ème</sup> génération**

La qualification de « nouvelle céphalosporine » exige actuellement, outre la résistance accrue à l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases, des CMI très basses vis à vis des Entérobactéries et de certains bacilles Gram négatif, une diffusion à des concentrations efficaces dans les sites inaccessibles jusque là aux céphalosporines précédentes, tels les méninges .

Céfotaxime, ceftriaxone, cefsulodine, céfépérazone, ceftazidime, céfotiam, ceftizozime répondant à ses critères.

Le Moxalactam qui est une oxacéphalosporine est assimilé à ce groupe compte tenu de ses propriétés.

#### **6.3.6.1. La Céfotaxime**

Nouvelle céphalosporine hémi-synthétique à utilisation strictement parentérale.

##### **6.3. 6.1.1. Propriétés physiques**

Poudre blanche à sensiblement blanche, insoluble dans l'eau, assez soluble dans les solvants organiques, et très soluble dans un mélange à volume égal de méthanol et d'eau distillée stérile.

##### **6.3.6.1.2. Activité antibactérienne**

- **Mode d'action**

L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne passe par une fixation de céfotaxime sur les protéines cibles ou PLP.

De plus, l'étude de la fixation sur ces protéines réceptrices a montré l'existence de « nouvelles » protéines PLP et une affinité particulièrement importante de la céfotaxime pour une protéine de haut poids moléculaire, ce qui impliquerait que le centre létal de la céfotaxime pourrait ne pas être inclus au sein des PLP habituelles.

D'un point de vue morphologique à concentration proche de la CMI, la céfotaxime entraîne la formation de cellules filamenteuses pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

A haute concentration, ou après une incubation prolongée, la céfotaxime entraîne une lyse cellulaire.

Le blocage de la PLP 3 est responsable des formes filamenteuses et éventuellement de la mort cellulaire.

Cette PLP 3 est donc la cible primitive.

Par ailleurs la céfotaxime apparaît particulièrement résistante à l'hydrolyse des  $\beta$ -lactamases.

- **Spectres d'Activités**

Il s'agit d'un spectre très large, étendu à la plupart des bactéries gram négatif, pour lesquelles les CMI de la céfotaxime des souches, par rapport aux céphalosporines antérieures. (CMI :0,01 à 1 $\mu$ g/ml)

Ainsi sont sensibles : *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Protéus mirabilis*, *Providencia*, (CMI 0,03 $\mu$ g/ml), *Entérobactérie, serratia*, *Proteus indole positif*, *Citrobacter*.

*Pseudomonas aeruginosa* est moyennement sensible (CMI : 4-8  $\mu$ g/ml) avec une activité comparable à celle des pénicillines antipyocyaniques.

*Acinobacter* est résistant à la céfotaxime comme aux autres nouvelles céphalosporines (CMI de 8-16  $\mu$ g/ml).

*Haemophilus* producteur ou non de pénicillinases, est particulièrement sensible (CMI<sub>m</sub> : 0,02  $\mu$ g/ml).

*Neisseria* est très sensible alors que les *listéria* le sont peu.

Vis-à-Vis des Gram positif, on ne note aucun avantage par rapport aux molécules antérieures.

De plus, l'Entérocoque est résistant.

Sur les anaérobies, la céfotaxime apporte un gain d'activité indiscutable chez certains germes.

#### **6.3.6.2. Autres**

Initialement dénommées céphalosporines à très large spectre, elles ont été classées dans les céphalosporines de 3<sup>ième</sup> génération. Il n'en existe que deux : céfépime, cefpirome

## **VII. METHODE D'EVALUATION DE L'ACTIVITE DES ANTIBIOTIQUES**

### **7.1. DEFINITIONS**

#### **CMI : Concentration Minimale Inhibitrice**

C'est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique d'un antibiotique.

#### **CMB : Concentration minimale bactéricide**

Elle est définie comme la plus petite concentration d'antibiotique laissant moins de 0,01% de survivants de l'inoculum initial après 18 à 24 heures de culture à 37°C. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique.

### **7.2. METHODE D'ETUDE**

#### **7.2.1. Détermination de la CMI**

Pour la détermination de la CMI, on a recours à une méthode de dilution ou à une méthode de diffusion ; ceci dans des conditions bien standardisées.

### **7. 2.1.1. Technique par dilution en milieu gélose**

C'est la technique de référence. Des concentrations croissantes de l'antibiotique sont réalisées. Chaque concentration est incorporée à un milieu gélose. Des boîtes de pétri peuvent être ensemencées avec plusieurs souches bactériennes à l'aide d'un ensemenceur multipoints. La CMI correspond à la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la formation de colonies visibles.

### **7.2.1.2. Technique par diffusion en milieu gélose (E-test)**

La plus utilisée actuellement est celle du **E-test**. Cette technique est fondée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antibiotique à tester.

Les bandelettes sont des supports inertes et hydrophobes de 80mm de long sur 5mm de large. 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 traduira par la présence d'une ellipse dont le point d'intersection avec la bandelettes définit la CMI.

L'échelle de concentration imprimée sur la face supérieure de la bandelette permet une lecture rapide.

### **7.2.1.3 Intérêt, problèmes et limites de la détermination de la CMI**

- **Intérêt (19, 22)**

Pour une souche donnée, la CMI d'un antibiotique est utilisée pour apprécier son efficacité.

Usuellement la souche sera dite sensible si la CMI est inférieure à la concentration d'antibiotique obtenue dans l'organisme. La souche sera considérée comme résistante si la CMI est supérieure aux concentrations

maximales retrouvées dans l'organisme. Ainsi la CMI pourrait être considérée comme un critère prédictif du résultat clinique.

La CMI est ainsi un paramètre d'évaluation permettant la comparaison entre la souche étudiée et d'autres bactéries notamment pour leur comportement vis à vis de l'antibiotique testé.

- **Problèmes et limites**

La CMI est une variable qui dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels l'hétérogénéité de la souche bactérienne et la sensibilité de la bactérie la moins sensible. Ainsi il a été montré que la CMI est déterminée à partir de dilutions successives d'antibiotiques, sa sensibilité dépendant du choix de la concentration de départ.

La CMI théorique est en réalité comprise entre deux points de gamme.

Notons que certaines molécules antibiotiques donnent dans l'organisme des métabolites actifs.

### **7 2.2. Détermination de la CMB**

La CMB est déterminée selon le même principe que pour la CMI en milieu liquide. Après lecture de la CMI, une numération des bactéries survivantes est effectuée à partir des concentrations d'antibiotiques supérieures à la CMI par repiquage sur gélose sans antibiotique. On détermine ainsi la plus petite concentration d'antibiotique laissant moins de 0,01% de bactéries survivantes par rapport à l'inoculum de départ.

Les méthodes d'études sont celles de dilution en milieu liquide. Elles sont réalisées soit en tubes (macrodilution) soit en micro plaques (microdilution). Le milieu le plus utilisé reste celui de Mueller-Hinton et les concentrations d'antibiotiques suivent une progression géométrique de raison  $\frac{1}{2}$ .

- **Problème et limites de la CMB**

Deux paramètres essentiels interviennent dans les méthodes d'études de la CMB : le temps d'incubation et le nombre de survivants fixé de manière arbitraire.

La CMB étant déterminée en point final (au bout de 24h), elle ne reflète pas la dynamique complexe de l'activité bactérienne et la phase de recroissance bactérienne pouvant le suivre.

Les problèmes liés à la stabilité de l'antibiotique en solution aqueuse ne sont pas mis en évidence par ce paramètre. La définition arbitraire du seuil de survivant entraîne une classification artificielle des souches et des souches résistantes ou tolérantes à l'effet bactéricide. Ainsi des souches voisines mais de part et d'autres de cette valeur de coupure seront séparées, alors que des souches de comportements cinétiques différents seront réunies.

La présence d'un effet paradoxal rend également difficile l'interprétation de la CMB. En effet avec certaines souches le pourcentage de survivants est inférieur à 0,01% pour les concentrations plus élevées ; ce qui pose le problème du choix de la concentration représentant la CMB. L'effet paradoxal est surtout retrouvé avec les  $\beta$ -lactamines, dans ce cas l'une des hypothèses explicatives serait que les fortes concentrations d'antibiotiques inhiberaient la synthèse des protéines bactériennes empêchant de ce fait la multiplication du germe.

L'utilisation de la CMB comme outil de la notion de tolérance est très discutée. En effet le phénomène de tolérance traduit une vitesse de bactéricidie plus lente. De manière classique la tolérance d'une souche est étudiée en calculant le rapport CMI/CMB qui doit être supérieur ou égal à 32 pour les souches tolérantes.

### **7.2.3. Facteurs techniques modifiant la CMI et la CMB**

L'activité bactériostatique et bactéricide des antibiotiques est soumise à l'influence de plusieurs facteurs techniques. Ceci limite la reproductibilité des

méthodes de détermination de la CMI et de la CMB. Différents paramètres du milieu de culture tels que la nature du récipient, l'agitation, l'atmosphère et le temps d'incubation influent sur la détermination de la CMI. D'autres facteurs importants peuvent aussi intervenir à savoir l'inoculum bactérien et le transport d'antibiotiques.

### **7.2.3.1. Influence du milieu de culture**

Le milieu de culture est un facteur important. Il affecte l'activité de certains antibiotiques de par sa teneur en cations, son pH et la présence de substances antagonistes diverses. De par sa qualité nutritive, le milieu va aussi influencer les paramètres de croissance de la bactérie ( phase de latence, vitesse, temps de génération).

- **Composition du milieu (17, 20)**

La composition du milieu en nutriments joue un rôle très important. Un milieu riche en peptones favorise l'effet des antibiotiques sur les bactéries en voie de multiplication (cas des  $\beta$ -lactamines) alors qu'un milieu pauvre contribue à l'action des antibiotiques sur les bactéries en repos. Les protéines du milieu peuvent aussi agir en se liant à une partie des antibiotiques.

En général, le milieu utilisé pour l'étude des antibiotiques est Mueller-Hinton. De part son activité inhibitrice sur les aminosides et les tétracyclines, le milieu trypticase-soja n'est pas approprié dans ce cas.

- **Influence de pH**

A pH acide, certains antibiotiques tels que les béta-lactamines ont une meilleure activité bactériostatique alors qu'un milieu alcalin favorise l'action des aminosides et des macrolides.

- **Atmosphère d'incubation**

Elle agit par modification du pH : une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> peut modifier le pH et diminuer l'activité d'antibiotiques tels que les aminosides (9).

### **7.2.3.2. Influence du récipient**

Le capacité du récipient va influencer le volume du milieu et de la population bactérienne globale. Les petits volumes de 100 à 200µl utilisés dans les micro-méthodes permettent l'étude de populations de 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup>. Ce niveau est généralement inférieur à la fréquence de mutations des bactéries rendant difficile l'émergence d'une hétérogénéité dans la population.(71).

La nature et la forme des récipients sont aussi importantes : plus la surface de contact avec le milieu de culture est grande plus l'activité bactéricide est faible et le taux de recroissance tardive élevé. Ce phénomène est provoqué par des bactéries adhérentes juste au dessus du ménisque à la paroi du récipient de culture. Ces bactéries ne sont pas en contact avec l'antibiotique et échappent de ce fait à l'action lytique (19). Le taux d'adhérence aux parois diffère selon la nature du récipient. Dans des conditions comparables, certains auteurs ont trouvé un taux d'adhérence et un taux de survivants plus élevés pour les tubes en plastiques par rapport aux tubes en verre. (52 )

Une agitation 4h avant le repiquage de la 24<sup>ème</sup> h est vivement conseillée pour permettre une remise en contact de l'antibiotique avec les bactéries localisées au niveau des parois. Cette agitation permet aussi la dispersion des agrégats bactériens qui se forment avec certaines espèces bactériennes notamment *P. aeruginosa*. Les bactéries situées au centre de ces agrégats peuvent en partie être protégées d'un éventuel contact avec l'antibiotique (71).

### 7.2.3.3. Autres facteurs influençant

- **L'inoculum bactérien**

Sa taille et son état physiologique sont très importants : l'activité bactéricide des antibiotiques diminue lorsque la taille de l'inoculum augmente. Ainsi l'ICS recommande pour la détermination des CMI et CMB l'utilisation d'inocula calibrés à  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml. Le NCCLS recommande un inoculum de  $5 \cdot 10^5$  pour les bactéries aérobies et un inoculum de  $5 \cdot 10^6$  UFC/ml pour les anaérobies. (53)

Concernant l'état physiologique, la phase de croissance est importante car l'action des antibiotiques ne s'exerce généralement que sur des bactéries en phase de croissance. Ainsi l'utilisation d'une culture stationnaire diminue l'activité bactéricide de la plupart des antibiotiques (19,40). Cependant pour certaines molécules telles que les pénèmes et les animosides, l'activité bactéricide peut s'exercer en l'absence de multiplication.(19)

- **Temps de réincubation**

Il est souvent limité à 24 h. Selon certains auteurs, un délai de 48 à 72 heures est nécessaire pour obtenir la croissance de toutes les bactéries viables sur le milieu de dénombrement. Cependant, l'allongement de ce temps peut entraîner la mort des bactéries qui ne se multiplient plus.

- **transport d'antibiotiques**

Lors du repiquage permettant le développement des bactéries survivantes et donc leur dénombrement, une quantité d'antibiotique peut-être transférée du milieu de culture sur les géloses. Cette quantité peut-être suffisante pour empêcher les croissances des bactéries viables et surévaluer de ce fait les activités bactéricides. Ce phénomène de << carry-over >> ou transport d'antibiotique est observé pour toutes les méthodes utilisées. Ce facteur est important pour les méthodes où un volume important (10µl ou plus) de mélange (antibiotique bactéries) est directement repiqué sur la gélose de dénombrement.

**DEUXIEME PARTIE :**  
**MATERIEL ET METHODES**

# **1. MATERIEL**

## **1.1. CADRE D'ETUDE**

Ce travail a été réalisé à l'unité de recherche et de biotechnologie bactérienne (Micro CSB system) du laboratoire de bactériologie –virologie du Centre Hospitalier Universitaire Aristide LE DANTEC (HALD) de Dakar.

## **1.2. ORIGINE DES SOUCHES**

L'espèce bactérienne étudiée est *Haemophilus influenzae*. Les souches sont collectées au niveau du laboratoire de l'Hôpital Aristide Le DANTEC (HALD). Elles proviennent de prélèvements divers :

- sécrétions rhino-pharyngées
- sécrétions génitales
- expectorations
- hémocultures
- otites (prélèvements auriculaires)
- LCR

## **1.3. LES ANTIBIOTIQUES**

Les antibiotiques testés appartiennent à la classe des  $\beta$ -lactamines, il s'agit :

- Amoxicilline
- Ampicilline
- Amoxicilline + Acide clavulanique
- Céfadroxil
- Céfatrizine
- Céfaclor
- Céfotaxime

#### **1.4. LES SOUCHES DE REFERENCE**

Une souche de référence est une souche qui possède tous les caractères d'un groupe de bactéries. Ces souches de références permettent d'effectuer le contrôle qualité des tests d'étude de sensibilité afin de valider les résultats.

Les souches de référence les plus fiables sont les celles de type American Type Culture Collection ( *ATCC* ).

Dans notre étude, nous avons utilisé le type *Haemophilus influenzae* *ATCC* 49247

#### **1.5. MATERIELS POUR ISOLEMENT**

- Autoclave
- Bacitracine
- Boites de pétri
- Bec Bunsen alimenté par une bouteille de gaz
- Etuve à 37°C
- Gélose Muller Hinton
- Générateur de CO<sub>2</sub> ou bougie
- Jarre d'incubation
- Polyvitex

#### **1.6. MATERIEL POUR LES MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS**

- Bouillon thioglycolate
- gélose au sang cuit (GSC)
- gélose au sang cuit de cheval à la bacitracine (GSC Baci)
- gélose au sang ordinaire
- sérum physiologique stérile

**1.7. MATERIEL POUR IDENTIFICATION**

- Eau physiologique
- Disques d'oxydase
- API BBL crystal

**1.8. MATERIEL POUR LA DETECTION D'UNE BETA-LACTAMASE**

- Anse de platine
- Disques de Nitrocéphine
- Eau physiologique
- Lames portes objets
- Pincés
- Bec Bunsen alimenté par une bouteille de gaz

**1.9. MATERIEL POUR LA DETERMINATION DE LA CMI PAR E-TEST®**

- Applicateur de **E-test®**
- Bandes de **E-test®**
- Boites de pétri circulaires
- Eau physiologique
- Ecouvillons stériles
- Gélose Muller Hinton sans ou avec sang cuit
- Pincés
- Pipettes graduées de 10 à 25ml
- Polyvitex
- Souches viables de 24 heures
- Souches de référence pour contrôle de qualité
- Tubes Mac Farland 0,5
- Tubes à hémolyse

### **1.1.0 MATERIEL POUR LA DETERMINATION DE LA CMI PAR DILUTION EN MILIEU GELOSE**

Le matériel utilisé est le suivant :

- antibiotiques du commerce sous forme de poudre d'une très grande pureté
- eau distillée stérile
- solvant et diluant appropriés selon l'antibiotique ( voir tableau suivant )

**TABLEAU 1 : Solvants et diluants de préparation des solutions d'antibiotiques**

<b>Antibiotiques</b>	<b>Solvants</b>	<b>Diluants</b>
Amoxicilline	Tampon phosphate 0,1M pH 6	Tampon phosphate 0,1M pH 6
Ampicilline	Tampon phosphate 0,1M pH 7	Tampon phosphate 0,1M pH 6
Céfadroxil	Tampon phosphate 0,1M pH 6	Eau distillée stérile
Céfatrizine	Eau distillée + Méthanol	Eau distillée stérile
Céfaclor	Eau distillée + Méthanol	Eau distillée stérile

### **1.11. MATERIEL POUR CONSERVATION**

- Bouillon cœur cervelle
- Cryotubes NUNC\*
- Gélose au sang cuit avec une pente

- Glycérol
- Lait écrémé

## **1.12. MATERIEL POUR L'EXPLOITATION DES RESULTATS**

WHONET IV

## **2. METHODES**

### **2.1. PREPARATION DES MILIEUX ET REACTIFS**

#### **2.1.1. Sérum physiologique**

- Chlorure de sodium : 9g
- Eau distillée : 1000 ml

Stériliser ensuite à l'autoclave à 120°C, répartir dans des tubes à essai en verre ( en général on met 10 ml par tube) et conserver.

#### **2.1.2. Gélose de Mueller-Hinton ( MH )**

Elle contient :

- infusion de viande de bœuf : 300g/l
- hydrolysate de caséine : 17,5 g/l
- amidon : 1,5 g/l
- gélose : 17 g/l

Son pH est de 7,4 et elle permet l'isolement de bactéries aérobies et anaérobies non exigeantes comme *Haemophilus influenzae*. Elle est très utilisée

dans l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, ce qui fait d'elle le milieu de référence pour cette étude.

### **Préparation de la gélose MH**

Le milieu est préparé à partir de milieux déshydratés contenus dans des bocaux en plastique sur demande au niveau du laboratoire ou sur le marché.

Sur les bocaux sont mentionnées les formules exactes de préparation.

### **2.1.3. Gélose au sang ordinaire : GSO**

La gélose au sang est un milieu solide enrichi de 5 à 10 % de sang. Elle est utilisée pour la culture de germes exigeants et aussi pour détecter l'hémolyse et apporter ainsi certains facteurs tels que : **X = hémine** et **V = NAD** qui sont nécessaires à la croissance des *Haemophilus*.

La préparation utilise une gélose ordinaire (Gélose Columbia) dont la formule est la suivante :

- mélange de peptones riches en acides aminés et en vitamines : 23 g/l
- amidon : 1 g/l
- chlorure de sodium : 5 g/l

### **Préparation de la GSO**

La préparation de la GSO utilise la gélose columbia, additionnée d'hématies de cheval ou de mouton à la concentration de 5%. Nous pouvons choisir du sang défibriné de cheval ou de mouton.

### **2.1.4. Gélose au sang cuit ( GSC )**

La GSC est obtenue en chauffant la gélose au sang déjà préparée à 70-80°C ; ce qui permet de détruire les inhibiteurs naturels et libérer les facteurs de croissance.

Cette gélose est ensuite refroidie à 50°C pour éviter la condensation .

**NB** : Ces trois milieux décrits : MH, GSO, GSC sont coulés dans des boites de pétri circulaires ( 90mm de diamètre ).

#### **2.1.5. Gélose au sang cuit à la bacitracine :**

- Milieu d'étude : GSC base
- Solvant : eau distillée
- Réalisation : ajouter 150 µg/l de milieu

La GSC à la bacitracine est obtenue en ajoutant à la GSC 300 mg/l de Bacitracine ; ce qui permet une inhibition de la plupart des bactéries de la flore pharyngée, en particulier celles des bactéries Gram positifs.

### **2.2. CONTROLE DE QUALITE DE LA GELOSE**

#### **2.2.1. Contrôle de la gélose :**

- vérifier la date de péremption du milieu disponible en poudre
- respecter la formule donnée sur la boite
- ajuster le pH du milieu
- autoclaver pour avoir un milieu stérile
- respecter la profondeur de la gélose en coulant le milieu dans des boites de pétri (4mm pour les bactéries ).

#### **2.2.2. Contrôle de la conservation des antibiotiques**

Les bandes de E-Test doivent être conservées dans un congélateur à – 20°C.

Toutes les cartouches non entamées peuvent être stockées à –20°C jusqu'à l'utilisation. Celles entamées sont re-scellées dans des dessiccateurs et conservées toujours à –20°C. Avant usage, les cartouches sont laissées quelques minutes à la température ambiante.

### **2.3. CONSERVATION DES MILIEUX DE CULTURE**

- à l'obscurité, la lumière solaire rend souvent les milieux impropres à la culture ;
- à l'abri de toute contamination venant de l'extérieur et contre toute évaporation d'eau.

### **2.4. METHODE D'ISOLEMENT**

Dans le cadre de notre étude, les souches utilisées ont été congelées à -70°C. Pour re-isoler, ces souches nous les avons repiquées sur gélose au sang cuit (GSC) additionnée de supplément vitaminé « Polyvitex »

On a utilisé également des milieux sélectifs pour éviter d'éventuelles souillures, GSC à la Bacitracine pour *H. influenzae*.

L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C, sous CO<sub>2</sub> pendant 24 à 48 heures.

### **Morphologie des souches après lecture** : ( lecture )

Les souches d'*H. influenzae* sont de petits bacilles immobiles à Gram (-) polymorphes se présentant sous forme de colonies lisses, rondes, bombées ou de colonies muqueuses, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

### **2.5. REGENERATION DES SOUCHES**

Les souches isolées sont conservées au réfrigérateur à -20°C dans des cryotubes (tubes NUNC) et chaque tube porte une étiquette avec les mentions suivantes :

- numéro de code ;
- nature du prélèvement ;
- origine du prélèvement ;
- nom de la souche isolée ;
- date de conservation.

La souche contenue dans le tube NUNC est ensuiteensemencée sur une gélose appropriée, incubée à l'étuve à 37°C, pendant au moins trois heures.

### **Conservation et stockage des boites fraîchement coulées :**

- à température ambiante pendant 12 heures
- au réfrigérateur (pas en dessous de 6°C) non scellées : 3 semaines
- au réfrigérateur (pas en dessous de 6 °C) sous film plastique : 3 mois

## **2.6. IDENTIFICATION DES BACTERIES**

### **2.6.1. *Haemophilus influenzae*:**

#### **2.6.1.1. Examen macroscopique :**

On obtient des colonies lisses, rondes, bombées, ou des colonies muqueuses, volumineuses ayant tendance à s'étaler.

En raclant légèrement ces colonies de la gélose au sang, on observe la formation de pus.

#### **2.6.1.2. Examen microscopique au Gram :**

Nous avons confectionné à partir d'une ou deux colonies un frottis qui a été ensuite coloré au Gram. L'observation au microscope à l'objectif 100 à immersion a montré des Bacilles Gram négatif, isolés, de petite taille, polymorphes et parfois capsulés.

#### **2.6.1.3. Caractères Biochimiques :**

Pour connaître les caractères biochimiques du genre nous avons fait l'étude de la catalase et l'API BBL crystal.

## **- La Catalase**

### **Principe :**

Il repose sur l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène par la catalase avec production d'eau et d'oxygène.

### **Technique :**

On dépose quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène à 3% sur un frottis obtenu à partir de colonies prélevées directement sur la gélose (viable de 24h). La production de bulles matérialise la libération d'oxygène.

### **Interprétation :**

- ✓ Réaction positive : production de bulles = présence de catalase
- ✓ Réaction négative : pas de bulles = absence de catalase.

## **- Api BBL crystal**

Les panels BBL crystal N/H ID contiennent 29 substrats biochimiques et enzymatiques déshydratés. Une suspension bactérienne contenue dans la solution inoculum est utilisée pour réhydrater les substrats.

### **Principe :**

Il repose sur la dégradation microbienne des substrats spécifiques détectés par différents systèmes d'indicateurs.

Ainsi l'hydrolyse enzymatique des substrats fluorogènes contenant des dérivés coumariniques de 4-méthylumbelliféron (4MU) ou de 7-amino-4-méthylcoumarine (7-AMC), résulte d'une augmentation de la fluorescence facilement détectée à l'aide d'une lampe (UV). Tandis que l'hydrolyse (celle) des substrats chromogènes entraîne des changements de coloration pouvant détectables à l'œil nu.

### **Technique :**

- 1) Préparer une suspension à partir de colonies prélevées sur gélose appropriée dans un tube de solution pour l'inoculum BBL crystal, après avoir au paravent reporté sur l'étiquette le numéro attribué à l'échantillon de la souche.

Il faut toujours utiliser un échantillon stérile avec embout de coton pour le prélèvement ou une mise en plastique jetable.

- 2) Reboucher le tube et agiter au vortex pendant 10-15 sec, le degré devrait être au moins égal au degré Mac Farland N°3.
- 3) Verser le contenu du tube de la solution de l'inoculum dans la zone cible de la base, puis faire glisser doucement l'inoculum le long des conduits jusqu'à ce que tous les puits soient entièrement remplis.
- 4) Placer le couvercle, puis appuyer jusqu'à ce que le couvercle soit parfaitement emboîté.
- 5) Placer les panelsensemencés dans des plaques d'incubation (face vers le bas), puis incuber dans un incubateur sans CO<sub>2</sub>, à 40-60 % d'humidité.

Le temps d'incubation est de 4h à une température de 35-37°C

- 6) Lecture dans un délai de 30 minutes (Tous les panels doivent être lus face vers le bas)
  - En premier, lire les colonnes F à J en se servant de la source de la lumière régulière ( lumière blanche).
  - Ensuite lire les colonnes de A à E (substrats fluorescents) en se servant de la source de lumière UV, puis nous comparons la fluorescente observée à celle obtenue dans le puit de contrôle négatif (noté) 4A.

**Noté bien :** Pour les résultats, on se réfère à la grille d'interprétation des réactions colorées et / ou au tableau 3 (annexe 1) pour l'interprétation des réactions.

*H. influenzae* possède une catalase et une oxydase. Il fermente le glucose, le maltose, le ribose et le xylose mais pas le lactose ou le saccharose. Des tests biochimiques permettent de séparer les différentes souches.

## **2.7. MANIPULATION CORRECTE**

Elle doit se faire en respectant la démarche du protocole établi :

- régénérer la gélose à l'étuve ( 37°C ) pendant 10 à 15 minutes ;
- comparer la turbidité de la suspension obtenue avec celle de l'étalon correspondant ( en fonction du germe sur l'échelle de Mac-Farland ) ;
- placer les bandes de **E-test®** en évitant de les déplacer sur la gélose car l'antibiotique diffuse en quelques secondes.

## **2.8. RECHERCHE DE LA PRODUCTION D'UNE BETA-LACTAMASE**

Dans notre étude, la production de  $\beta$ -lactamases a été recherchée par la méthode de la Céfinase qui est très sensible.

### **Principe :**

Cette méthode est basée sur la détection de l'enzyme produite grâce à son capacité d'hydrolyser le cycle  $\beta$ -lactame d'une céphalosporine chromogène (jaune au départ et qui vire au rouge en cas d'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame). Le chromogène utilisé est la nitrocéfine qui possède une grande affinité pour la plupart des  $\beta$ -lactames. Elle est présentée sous forme de disque.

### **Modèle Opératoire :**

- sur la lame porte-objet, déposer un disque de CEFINASE
- humidifier le disque à l'eau physiologique
- prélever plusieurs colonies et déposer sur le disque

**Lecture :**

La souche est dite productrice de  $\beta$ -Lactamases, si la réaction vire au **rouge**.

**2.9. METHODE D'ETUDE DE LA SENSIBILITE IN VITRO**

Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) des antibiotiques utilisés (les  $\beta$ -lactamines).

**2.9.1. Définition :**

Un antibiotique est dit **bactériostatique**, si le rapport CMB/CMI est **supérieur à 2**. Par contre un antibiotique est dit **bactéricide**, si le rapport CMB/CMI est **inférieur à 2**.

Ainsi la détermination de cette CMI a permis de retenir trois catégories cliniques pour l'interprétation des tests de sensibilité in vitro : sensibles (**S**), résistantes (**R**) et intermédiaires (**I**).

**2.9.2. Techniques d'étude :****2.9.2.1. E-test :****Principe :**

Le **E-test** est une technique de détermination directe de la CMI qui associe les caractéristiques des méthodes de dilution et de diffusion en milieu gélose. Des bandelettes inertes de 5 mm de large et 50 mm de long, calibrées par un gradient de concentrations de l'antibiotique à tester, couvrant une zone de 0,016 à 256 mg/l ou de 0,002 à 32 mg/l, sont déposées à la surface d'un milieu gélose préalablement ensemencé avec la souche bactérienne à tester.

L'inhibition de la croissance se traduit par la présence d'une ellipse dont les points d'intersection avec la bandelette définissent la CMI.

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

### **Mode opératoire :**

- Réaliser une suspension bactérienne en faisant passer un écouvillon stérile sur la culture obtenue sur gélose Trypticase soja ou GSC.
- Comparer la turbidité obtenue avec celle de l'étalon 0,5 de l'échelle Mac-FARLAND.
- Ensemencer la boîte de Pétri en stries serrées avec la suspension.
- Déposer à la surface de la gélose des bandelettes inertes, calibrées par un gradient de concentrations de l'antibiotique à tester.
- Procéder de la même façon avec la souche de référence.
- Incuber à l'étuve à 37°C, pendant 18 à 24 heures.

### **Lecture :**

Après incubation, nous observons que la culture bactérienne est arrêtée lorsque la concentration atteint sa CMI. Ainsi, nous lisons directement la CMI qui est définie par l'intersection de l'ellipse avec l'échelle imprimée sur la face supérieure de la bandelette.

La lecture reste facile lorsque la zone d'inhibition est symétrique. Cependant, l'observation d'un décrochage ou « *dip* » dans la zone d'inhibition impose une lecture par extrapolation de la courbe de l'ellipse.

La présence de colonies « squatters » doit être analysée. Il peut s'agir d'une résistance hétérogène, de l'émergence de mutants résistants ou d'un mélange bactérien.

L'existence d'une hémolyse sur gélose au sang peut rendre délicate l'estimation de la CMI et ne doit pas interférer avec la lecture.

Une croissance bactérienne en ligne le long de la bandelette n'a aucune signification bactériologique et elle est certainement due à une gélose insuffisamment séchée avant le dépôt de la bandelette.

Les points d'intersection sur la bandelette peuvent être asymétriques et dans ce cas, la CMI correspond à la concentration la plus élevée ayant été lue sur la règle.

Dans tous les cas, une souche de référence doit être étudiée en parallèle comme contrôle de qualité, afin d'éviter les erreurs d'interprétation.

#### **2.9.2.2. Méthode de dilution sur gélose**

##### **Principe**

Cette méthode utilise un appareil dénommé « Inoculateur Multipoint » qui permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique qui est incorporé à différentes concentrations dans la gélose de culture. Cet appareil effectue sur la gélose un dépôt de la suspension bactérienne qui, après 24 à 48 heures à l'étuve à 37°C, donne la CMI en comparant avec les cultures des autres boîtes de pétri. Il est plus aisé de commencer par la plus petite concentration d'antibiotique. Et cette CMI va donc correspondre à la première boîte dont le dépôt n'a pas donné de culture.

Cette technique est offerte la possibilité d'étudier simultanément plusieurs types de bactéries par rapport à un antibiotique.

## Mode opératoire

### Préparation de la solution mère de l'antibiotique à étudier

Pour chaque antibiotique étudié, la connaissance du solvant, du diluant et de l'activité spécifique de la poudre disponible est obligatoire.

Dans notre étude, nous avons choisi une concentration de 10,240 µg/ml pour la solution mère pour un volume de 10 ml à préparer, ce qui nous permet donc de déterminer la masse M<sub>1</sub> de poudre d'antibiotique à peser :

### Solution mère

M<sub>1</sub> = masse de poudre à peser

$$M_1 = \frac{\text{Volume à préparer} \times \text{Concentration}}{\text{Activité spécifique}}$$

- Mesurer 10 ml de solvant et y ajouter la masse M<sub>1</sub> de poudre.
- Répartir cette solution mère obtenue dans des tubes NUNC, en raison de 1,1 ml (pour prévenir les pertes car nous avons besoin d'1 ml en réalité).
- Conserver ces tubes NUNC à -70°C.

Chaque tube NUNC contenant 1,1 ; M<sub>1</sub> pourra servir à une étude.

### Repiquage des souches régénérées

Les souches préalablement régénérées dans la gélose Trypticase-Soja sont repiquées dans une boîte de pétri contenant de la gélose (MH pour *Haemophilus influenzae*) et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Le repiquage s'effectue 24 heures avant la manipulation proprement dite.

### Préparation de la gélose

La manipulation nécessite 1,5 litres de gélose. Pour cela :

- Peser 52,5g de poudre de MH et mesurer avec la burette 1,5 litre d'eau distillée et faire bouillir dans une casserole propre.
- Dès que l'eau commence à s'échauffer, ajouter la poudre de gélose en remuant jusqu'à ébullition.
- Répartir cette gélose dans 3 flacons de 500 ml.
- Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes, puis placer au bain-marie pendant au moins 30 minutes.

Dans le cas des *Haemophilus*, du sang de cheval est incorporé dans la gélose en raison de 25 ml pour 500 ml de MH en vue d'obtenir de la GSC.

### Préparation de la gamme de dilution de l'antibiotique

- Distribuer 1 ml de diluant dans 12 tubes à hémolyse puis transvaser dans le premier tube, le contenu d'un tube NUNC renfermant 1 ml de la solution mère.
  - Agiter ce mélange pour homogénéiser. Ce tube contient maintenant 2 ml d'une solution concentrée à  $10.240/2 \mu\text{g/ml}$ , soit  $5120 \mu\text{g/ml}$ . Dans ce tube, nous avons réalisé une dilution au demi ( $1/2$ ) de la solution mère d'antibiotique.
    - Prélever 1 ml de ce premier tube à hémolyse puis l'ajouter dans le deuxième tube. Ce second tube contient alors un volume  $V = 2 \text{ ml}$  d'une solution concentrée à  $5120 / 2 \mu\text{g/ml} = 2560 \mu\text{g/ml}$ .
    - Procéder ainsi de suite jusqu'à la concentration  $2,5 \mu\text{g/ml}$ .

A la fin, les 14 tubes à hémolyse devaient contenir chacun 1 ml de solution.

### Dilution de l'antibiotique dans la gélose

- Verser le contenu du premier tube à hémolyse (1 ml d'une solution concentrée à 5120 µg/ml) dans la boîte de Pétri puis ajouter 19 ml de gélose dans ladite boîte.

Nous avons donc réalisé dans cette boîte une dilution au /20<sup>ème</sup>, ce qui a permis d'obtenir une nouvelle concentration de l'antibiotique =  $5120/20 = 256 \mu\text{g/ml}$ .

- Laisser les boîtes sécher à la température ambiante.
- Procéder ainsi pour tous les autres tubes à hémolyse de la gamme de dilution de l'antibiotique. La dernière concentration sur la quatorzième boîte de pétri était de 0,032 µg/ml.
- Lorsque la gélose devient compacte par séchage à l'air, on réchauffe les boîtes à l'étuve à 37°C pendant une heure.

### Préparation de l'inoculum des souches à étudier

- A partir des boîtes repiquées la veille, toucher 5 à 6 colonies mélangées à de l'eau physiologique de façon à obtenir une turbidité comparable à l'étalon 0,5 de l'échelle Mac-FARLAND.
- Effectuer ensuite une dilution avec cette suspension. Cette dilution sera au 1/10<sup>ème</sup> pour *Haemophilus influenzae*.

### Manipulation

- Remplir chaque cupule de l'inoculateur Multipoint avec la suspension d'un germe en notant l'ordre dans lequel les cupules sont placés.
- Brancher l'appareil de manipulation (Inoculateur Multipoint), puis effectuer les dépôts automatiques sur chaque boîte de pétri.
- Sécher les boîtes à la température ambiante puis incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

**Lecture :**

Elle s'est fait en comparant la culture obtenue dans les quatorze boîtes de pétri. On commence par la boîte contenant la plus faible concentration de l'antibiotique (0,0312 µg/ml) pour aller vers la plus grande concentration (256 µg/ml).

La concentration minimale inhibitrice correspond à la concentration de l'antibiotique dans la première boîte où le dépôt ne donne aucune colonie. Lorsque la manipulation est correcte, on ne note aucune colonies dans les boîtes contenant une concentration d'antibiotique supérieure à la CMI.

**2.9.2.3. Méthode de dilution en milieu liquide :****Ensemencement des micro plaques et lecture**

Nous avons utilisé la méthode de micro-dilution en milieu liquide. Dans les cupules d'une micro plaque stérile, on distribue 100µl de bouillon de culture adéquat, sur une série de 16 cupules avant de procéder à une dilution sériée de 2 à 2 de 100µL de la solution d'antibiotiques à 1020 mg/l (dilution au dixième de la solution mère). La première cupule ne reçoit pas l'antibiotique, elle sert de témoin. Sur la série de 15 cupules suivantes, on aura la gamme décroissante de concentrations en antibiotique allant de 512µg/ml à 0,03µg/ml.

Ces cupules ainsi préparées reçoivent chacune 100µl de l'inoculum bactérien qui est une suspension bactérienne calibrée à  $10^6$  UFC/ml (Mac Farland 0,5).

Les concentrations d'antibiotique dans ces cupules vont chuter de moitié.

L'incubation est effectuée dans une étuve à 37°C.

Afin de déterminer les CMB, un repiquage sur un milieu gélose sans antibiotique en raison de 10µl pour chaque cupule test sera effectué après 24h de mise en contact. Ce repiquage n'est pas nécessaire pour les cupules montrant un trouble donc une croissance bactérienne évidente.

Cette méthode permet de déterminer au bout de 18 à 24 heures la concentration minimale inhibitrice qui est la plus faible concentration d'antibiotique entraînant l'inhibition de toute croissance visible dans les cupules au bout de 24 heures. Elle permet aussi la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) qui est la plus faible concentration d'antibiotique permettant de détruire 99,9% de la population bactérienne au bout de 18 à 24 heures de contact. La lecture se fera sur les géloses de dénombrement 24 heures après leur repiquage. Le seuil de coupure pour établir une bactéricidie à 99,9% est de 5 colonies.

#### **2.9.2.4. Critère d'interprétation :**

##### **- Calcul des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>**

C'est la détermination de la médiane par la méthode d'extrapolation linéaire.

Les CMI<sub>50</sub> et les CMI<sub>90</sub> sont données par la formule suivante :

$$X = \frac{A - B}{C - B} \times (Z - Y) + Y$$

Si **X** = CMI<sub>50</sub>

**A** = moitié des colonies inhibées

**B** = effectifs cumulés immédiatement inférieurs à **A**

**C** = effectifs cumulés immédiatement supérieurs à **A**

$$\mathbf{B} < \mathbf{A} < \mathbf{C}$$

$$\mathbf{Y} = \text{CMI de } \mathbf{B}$$

$$\mathbf{Z} = \text{CMI de } \mathbf{C}$$

Si  $\mathbf{X} = \text{CMI}_{90}$

$\mathbf{A} = 90\%$  des souches inhibées

$\mathbf{B} =$  effectifs cumulés immédiatement inférieurs à  $\mathbf{A}$

$\mathbf{C} =$  effectifs cumulés immédiatement supérieurs à  $\mathbf{A}$

$$\mathbf{B} < \mathbf{A} < \mathbf{C}$$

$$\mathbf{Y} = \text{CMI de } \mathbf{B}$$

$$\mathbf{Z} = \text{CMI de } \mathbf{C}$$

**TROISIEME PARTIE :**  
**RESULTATS**

## **I. SOUCHES BACTERIENNES**

Nous avons travaillé sur un collectif de 22 souches d'*Haemophilus influenzae*, dont une souche de référence (*Haemophilus influenzae* ATCC 49247), 7 souches en provenance de l'hôpital Aristide Le DANTEC (HALD) et 14 souches conservées au laboratoire de bactériologie de l'HALD à  $-70^{\circ}\text{C}$  dans du lait écrémé et dans du bouillon cœur-cerveille.

## **II. RESULTATS DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES**

### **2.1. RESULTATS DE LA DETECTION DES $\beta$ -LACTAMASES**

Sur les 22 souches étudiées, nous avons détecté 8 souches productrices de  $\beta$ -lactamases (36,4%), et ces souches détectées étaient toutes résistantes à l'amoxicilline. Seule 1 souche montre une résistance à l'association Amoxicilline-acide clavulanique. Ce qui nous a donc permis de dire que les résistances notées seraient probablement dues à une sécrétion de  $\beta$ -lactamases par les souches.

Il faut aussi signaler que pour l'ampicilline, outre les 8 souches productrices de  $\beta$ -lactamases, 2 souches non productrices de  $\beta$ -lactamases se sont montrées résistantes, et que toutes les souches productrices de  $\beta$ -lactamases étaient, soit résistantes, soit modérément sensibles aux céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération.

## 2.2. RESULTATS DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DETERMINEE PAR E-TEST

**TABLEAU I : Sensibilité aux antibiotiques selon les souches d'*Haemophilus influenzae***

(ED = EDWUIGE, GL= Grand Laboratoire)

SOUCHES → ANTIBIOTIQUES ↓	Valeurs critiques	Souche de référence	18 ED	12 ED	10 ED	2007	13	35 ED	10b	32 ED	14	21	31b	11	36	19	15	73	33	28	33 ED	32	556 GL
<b>Amoxicilline</b>	1-4	0,016	0,032	0,032	0,064	0,25	>256	0,016	16	0,125	0,032	0,023	0,094	>128	16	64	>256	24	0,016	>256	0,125	0,023	0,023
<b>Amoxicilline/ acide clavulanique</b>	1-4	0,016	1	0,016	0,064	0,125	0,25	0,064	0,5	1	0,125	0,016	0,064	0,125	2	0,064	8	0,094	0,125	0,125	0,125	0,94	0,125
<b>Céfotaxime</b>	2-4	0,75	0,032	0,023	0,032	0,023	0,75	0,75	0,023	0,032	0,023	2	0,023	0,023	0,75	0,023	0,75	0,023	0,032	0,023	0,032	0,023	0,023

### 2.3. RESULTATS DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES DETERMINEE PAR DILUTION EN MILIEU GELOSE

**TABLEAU II : Sensibilité aux antibiotiques selon les souches d'*Haemophilus influenzae***

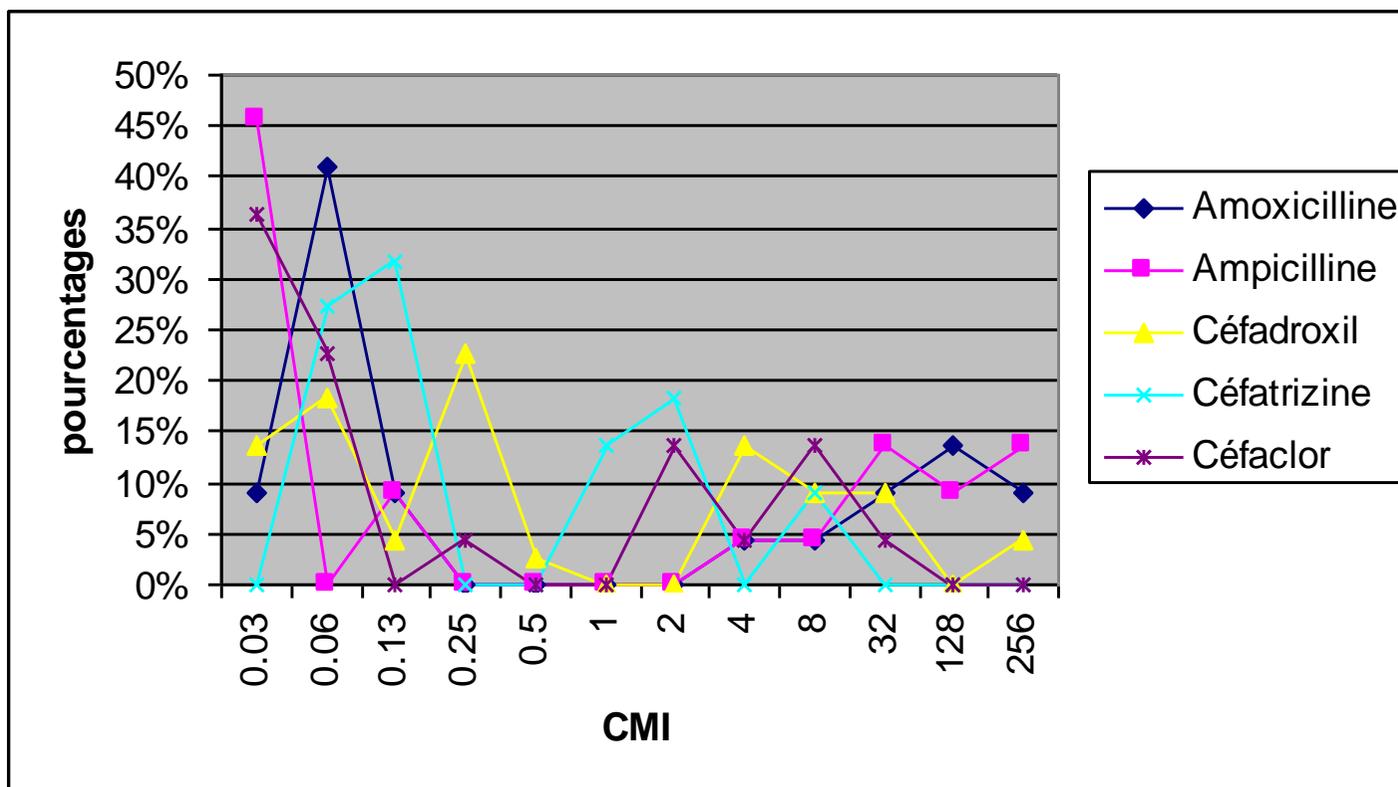
(ED = EDWUIGE, GL= Grand Laboratoire)

SOUCHES → ANTIBIOTIQUES ↓	VALEURS CRITIQUES	SOUCHE DE REFERENCE	18 ED	12 ED	10 ED	2007	13	35 ED	10B	32 ED	14	21	31B	11	36	19	15	73	33	28	33 ED	32	556 GL
<b>Amoxicilline</b>	1-4	0,064	0,064	4	0,064	0,125	256	0,064	32	0,032	0,064	0,064	0,032	128	8	32	256	128	0,064	256	0,125	0,064	0,064
<b>Ampicilline</b>	1-4	0,032	4	8	0,032	0,032	128	0,032	256	0,032	0,125	0,032	0,125	128	32	32	256	32	0,032	256	0,032	0,032	0,032
<b>Céfadroxil</b>	2-8	0,032	0,25	0,064	0,25	0,064	8	0,25	32	0,25	0,25	0,5	0,064	4	4	4	32	8	0,125	128	0,064	0,032	0,032
<b>Céfatrizine</b>	2-4	0,125	0,125	0,064	0,064	1	1	0,064	2	0,125	0,125	0,064	0,125	1	2	2	8	2	0,064	8	0,064	0,125	0,125
<b>Céfactor</b>	2-4	0,032	0,064	0,032	0,064	0,064	2	0,032	8	0,032	0,25	0,064	0,064	8	2	2	8	4	0,032	32	0,032	0,032	0,032

**2.4. NOMBRE DE SOUCHES SENSIBLES AUX ANTIBIOTIQUES SELON LES CMI :**

**TABLEAU III : Répartition des souches selon leurs CMI (µg/ml)**

CMI → Antibiotiques ↓	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	32	128	256
Amoxicilline	2	9	2					1	1	2	3	2
Ampicilline	10		2					1	1	3	2	3
Céfadroxil	3	4	1	5	1			3	2	2		1
Céfatrizine		6	7			3	4		2			
Céfaclor	8	5		1			3	1	3	1		



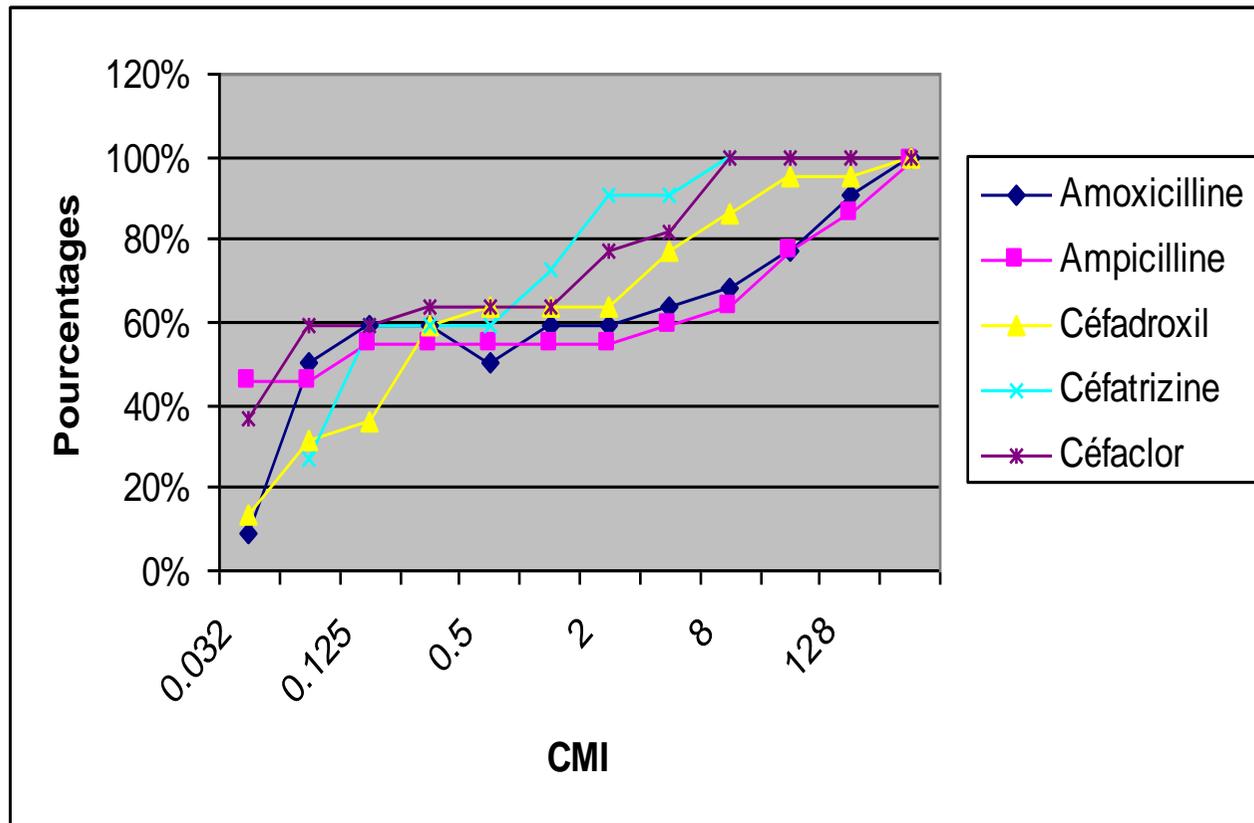
CMI : µg/ml

**FIGURE 2** : Pourcentages d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae*

**2. 5. EFFECTIFS CUMULATIFS D'INHIBITION DES SOUCHES D'*HAEMOPHILUS INFLUENZAE* PAR LES DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES :**

**TABLEAU IV : Effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae***

CMI → Antibiotiques ↓	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<b>Amoxicilline</b>	2	11	13	13	13	13	13	14	15	15	17	17	19	22
<b>Ampicilline</b>	10	10	12	12	12	12	12	13	14	14	17	17	19	22
<b>Céfadroxil</b>	3	7	8	13	14	14	14	17	19	19	21	21	22	
<b>Céfatrizine</b>	0	6	13	13	13	16	20	20	22					
<b>Céfaclor</b>	8	13	13	14	14	14	17	18	21	22				



CMI : µg/ml

**FIGURE 3 :** Pourcentages cumulatifs d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae*.

### III. PROFIL GLOBAL DES SOUCHES D'HAEMOPHILUS INFLUENZAE

#### 3.1. PROFIL DE SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES D'HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Les tableaux ci dessous (V ET VI) nous montrent le profil de sensibilité aux antibiotiques d'*Haemophilus* en fonction des CMI trouvées.

**TABLEAU V : activité globale des antibiotiques sur l'ensemble des souches ( Dilution sur gélose )**

CMI → Antibiotiques ↓	Valeurs critiques		%de souches résistantes	%de souches intermédiaires	% de souches sensibles	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
<u>Amoxicilline</u>	S≤1	R≥4	40.9	0	59.1	0.11	170.6
<u>Ampicilline</u>	S≤1	R≥4	45.4	0	54.6	1.38	170.6
<u>Céfadroxil</u>	S≤2	R≥8	22.8	13.6	63.6	0.2	24
<u>Céfatrizine</u>	S≤2	R≥4	9.1	0	90.9	0.11	5.67
<u>Céfaclor</u>	S≤2	R≥4	22.8	0	77.2	0.05	6.67

Le tableau V montre que les souches d'*H. influenzae* sont globalement sensibles aux  $\beta$ -lactamines en général et plus particulièrement aux céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération (cefatrizine ,cefaclor), qui exercent une très bonne activité avec des taux respectifs de 90,90% et de 77,20% de souches sensibles .

Cependant nous notons de fortes résistances aux pénicillines du groupe A à savoir l'Amoxicilline et l'Ampicilline avec des taux élevés de résistance, respectivement 40,9% et 45,4%.

Il est également à noter que les Céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération (céfadroxil) et de 2<sup>ème</sup> génération (céfatrizine, céfator) ont montré des souches modérément sensibles avec des CMI proches de la résistance.

**TABLEAU VI : activité globale des antibiotiques sur l'ensemble des Souches (E-test )**

Souches → Antibiotiques ↓	Valeurs critiques		%de souches résistantes	%de souches intermédiaires	%de souches sensibles	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>
	S≤1	R≥4					
<b>Amoxicilline</b>	S≤1	R≥4	36.4	0	63.6	0.09	22
<b>Amoxiciline-Acide clavulanique</b>	S≤1	R≥4	4.5	0	94.5	0.09	0.97
<b>Céfotaxime</b>	S≤2	R≥4	0	0	100	0.02	0.7

Comme pour la diffusion sur gélose, le E-test nous montre une très bonne activité des β-lactamines sur les 22 souches d'*Haemophilus* testées.

Cependant des résistances ont été observées ; elles sont très fortes pour l'Amoxicilline, mais faibles voire nulles pour l'association Amoxicilline-acide clavulanique et la céfotaxime.

Ce qui témoigne de la bonne activité de ces deux derniers antibiotiques sur les souches d'*H. influenzae* productrices ou non de  $\beta$ -lactamases.

**3.2. EFFECTIFS CUMULATIFS D'INHIBITION DES SOUCHES D'*HAEMOPHILUS INFLUENZAE*  $\beta$ -LACTAMASES (+) ET (-) PAR LES DIFFERENTS ANTIBIOTIQUES :**

**TABLEAU VII : Effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae*  $\beta$ -lactamases (+) et (-)**

CMI →		Nbre	0.032	0.064	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Antibiotiques ↓																
BI+	Amoxiciline	8									1	1	3	3	5	8
BL-	Amoxiciline	14	4	13	13	13	13	13	13	14						
BL+	Ampicilline	8											3	3	5	8
BL-	Ampicilline	14	10	10	12	12	12	12	12	13	14					
BL+	Céfadroxil	8								3	5	5	7	7	8	
BL-	Céfadroxil	14	3	7	8	13	14									
BL+	Céfatrizine	8						2	6	6	8					
BL-	Céfatrizine	14	0	6	13	13	13	14								
BL+	Céfactor	8							3	4	7	7	8			
BL-	Céfactor	14	8	13	13	14										

Sur les 22 souches isolées, 8 ont présenté une réaction positive à la cefinase soit un pourcentage de 36,4%. Le tableau VII montre que l'inhibition des souches  $\beta$ -lactamases (+) commence à des CMI supérieures ou égales à 1 $\mu$ g/ml pour toutes les molécules, elle est de 0,032 $\mu$ g/ml pour les souches  $\beta$ -lactamases (-).

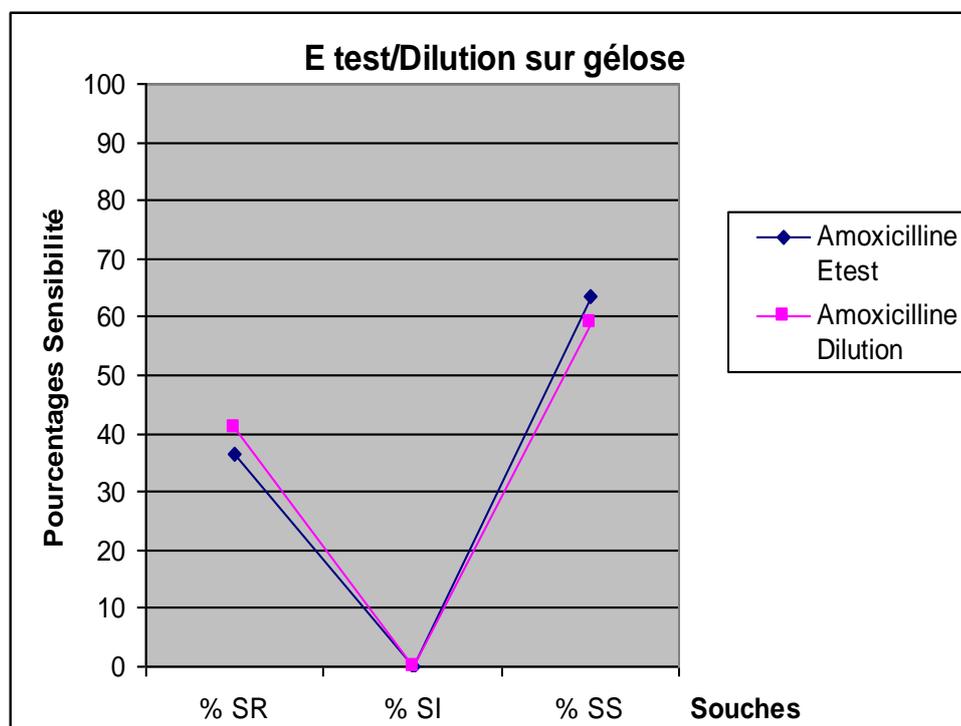
L'inhibition totale des souches  $\beta$ -lactamases (+) est obtenue à 256 $\mu$ g/ml pour l'Amoxicilline et l'Ampicilline et respectivement 128, 8 et 32 $\mu$ g/ml pour le céfadroxil, céfatrizine, céfachlore. Alors qu'une concentration inférieure ou égale à 8 $\mu$ g/ml pour les Aminopénicillines et à 1 $\mu$ g/ml pour les céphalosporines inhibe l'ensemble des souches  $\beta$ -lactamases (-).

### 3.3. COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS APRES DILUTION SUR GELOSE ET CEUX OBTENUS APRES DIFFUSION SUR GELOSE (E-TEST)

Les résultats obtenus sont presque superposables. En effet, pour l'Amoxicilline des résistances ont été notées aussi bien avec le E-test ( 36,4%) qu'avec la dilution en milieu gélose (40.9%).

De même les céphalosporines se sont révélées très actives comme l'ont montré les résultats de la céfotaxime (E-test) avec 100% de souches sensibles, du céfadroxil, de la céfatrizine et du céfador (dilution sur gélose) avec respectivement, 63,6%, 90,9%, 77,6% de souches sensibles.

Cependant, il est à noter que certaines souches d'*H. influenzae* se sont montrées modérément sensibles avec des CMI proches de la résistance.



**Figure 4 :** Courbes comparatives des résultats de la sensibilité de l'amoxicilline obtenus après E-test et après dilution sur gélose

#### 4. ETUDE DES CONCENTRATIONS MINIMALES BACTERICIDES

##### 4.1. RESULTATS DES CONCENTRATIONS MINIMALES BACTERICIDES

**TABLEAU VIII : CMB de chaque souche d'*Haemophilus influenzae* obtenue après 24 h de culture**

(ED = EDWUIGE, GL= Grand Laboratoire)

CMI → Antibiotiques ↓	Valeurs critiques	Souche de référence	18 ED	12 ED	10 ED	2007	13	35 ED	10b	32 ED	14	21	31b	11	36	19	15	73	33	28	33 ED	32	556gl
Amoxicilline	1-4	0,064	0,064	8	0,064	0,125	256	0,25	64	0,064	0,25	0,125	0,032	256	16	128	256	256	0,125	256	0,125	0,064	0,064
Ampicilline	1-4	0,032	16	64	0,064	0,032	256	0,064	256	0,064	0,5	0,032	0,5	256	128	128	256	32	0,032	256	0,032	0,032	0,064
Céfadroxil	2-8	0,032	0,25	0,5	0,125	0,064	8	0,25	32	0,25	0,25	8	0,064	4	8	8	32	8	0,125	128	0,064	0,032	0,032
Céfatrizine	2-4	0,125	0,25	0,064	0,125	1	1	0,064	4	0,125	0,25	0,064	0,125	1	4	4	8	8	0,25	16	0,064	0,25	0,125
Céfaclor	2-4	0,064	0,064	0,064	0,064	0,125	1	0,032	8	0,064	0,25	0,064	0,064	8	2	2	8	0,032	0,032	32	0,064	0,064	0,032

**4.2. ETUDE DE L'ACTIVITE BACTERICIDE ET BACTERIOSTATIQUES DES SOUCHES  
D'HAEMOPHILUS INFLUENZAE**

**TABLEAU IX : Résultats du rapport CMB/CMI des antibiotiques pour chaque souche d'*Haemophilus influenzae***

(ED = EDWUIGE, GL= Grand Laboratoire)

Souches → Antibiotiques ↓	Souche de référence	18 ED	12 ED	10 ED	2007	13	35 ED	10b	32 ED	14	21	31b	11	36	19	15	73	33	28	33 ED	32	556gl
Amoxicilline	1	1	2	1	1	1	4	2	2	2	2	1	2	2	4	1	2	2	1	1	1	1
Ampicilline	1	4	8	2	1	2	2	1	2	4	1	4	2	4	4	1	1	1	1	1	1	2
Céfadroxil	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	16	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
Céfatrizine	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	2	1	4	4	2	1	2	1
Céfaclor	2	1	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1

**TABLEAU X : CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches d'*Haemophilus influenzae***

CMB/CMI → Antibiotiques ↓	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>
<b>Amoxicilline</b>	11	9	2		
<b>Ampicilline</b>	10	6	5	1	
<b>Céfadroxil</b>	17	4			1
<b>Céfatrizine</b>	14	8			
<b>Céfaclor</b>	12	8	2		

Les tableaux IX et X montrent que la quasi-totalité des antibiotiques a présenté une activité bactéricide avec des rapports CMB/CMI faibles et inférieurs ou égales à 2. Cependant certaines souches ont montré des effets bactériostatiques avec des rapports CMB/CMI compris entre 4 et 16.

Aucune souche tolérante n'a été notée.

**TABLEAU XI : Pourcentages des rapports CMB/CMI des antibiotiques testés sur les souches d'*Haemophilus influenzae***

	<b>Bactéricidies</b>	<b>Bactériostaties</b>
<b>Amoxicilline</b>	90,9%	9,1%
<b>Ampicilline</b>	72,7%	27,3%
<b>Céfadroxil</b>	95,5%	4,5%
<b>Céfatrizine</b>	100%	
<b>Céfaclor</b>	90,9%	9,1%

Le tableau XI nous montre que tous les antibiotiques testés ont donné des effets bactéricides sur plus de 90% des souches, sauf l'ampicilline qui n'a donné que 72,7%.

Nous notons également que le caractère bactéricide des pénicillines du groupe A à savoir amoxicilline et ampicilline sont comparables même si le pourcentage de bactériostatie est plus élevé pour l'ampicilline(27,8%) que pour l'amoxicilline.

Le céfadroxil est à 95,45% bactéricide et à 4,55% seulement bactériostatique sur les souches d'*Haemophilus influenzae*.

Et pour ce qui est des céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération, même si le céfACLOR s'avère bactéricide à 90,9% sur les souches étudiées, il l'est moins que la céfATRIZINE qui a donné un effet bactéricide de 100% des souches.

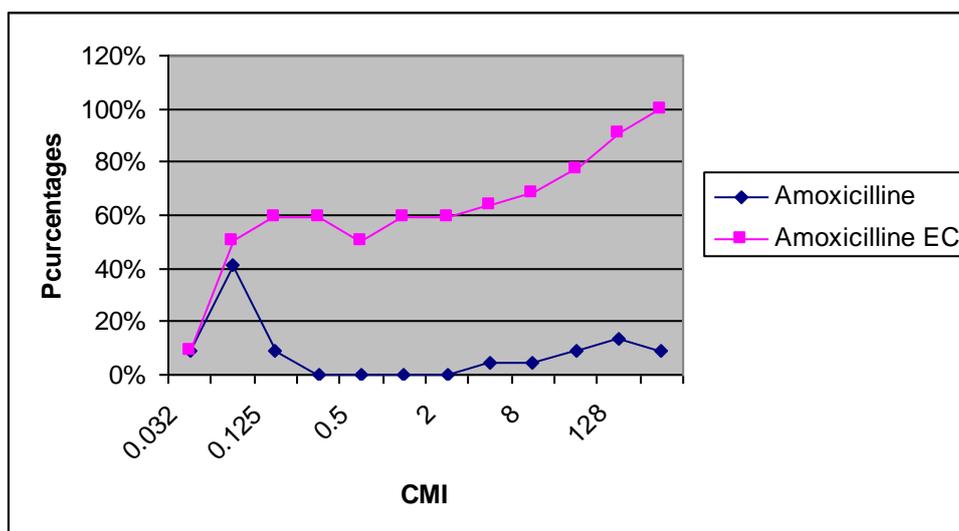
## 5. ACTIVITE DES $\beta$ -LACTAMINES

### 5.1. ACTIVITE DE L'AMOXICILLINE

**TABLEAU XII : activité de l'amoxicilline sur l'ensemble des souches testées**

Résultats des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )

Valeurs extrêmes ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\leq 1$	1- 4	$\geq 4$
Profil	S	I	R
Pourcentage	59.1	0	40,9



**Figure 5** : Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par l'amoxicilline.

Les souches testées sont assez sensibles à l'Amoxicilline comme le montre le tableau ci dessus avec 59,1% de souches sensibles, dont près de 50% avec des CMI très basses 0,064 $\mu\text{g/ml}$ .

Toutefois nous avons noté des souches résistantes à 40,9% avec des CMI allant de 4 µg/ml à 256µg/ml ; résistances qui sont sûrement dues à une production de β-lactamases.

#### Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

CMI	Valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Amoxicilline	1- 4	0,11	170.6

Ce tableau montre des CMI<sub>90</sub> très élevées (170.6µg /ml), ce qui confirme le pourcentage élevé de souches résistantes à l'amoxicilline.

Cette résistance est probablement liée à une production de β-lactamases par les souches, en effet n'ont été résistantes que les souches productrices de β-lactamases.

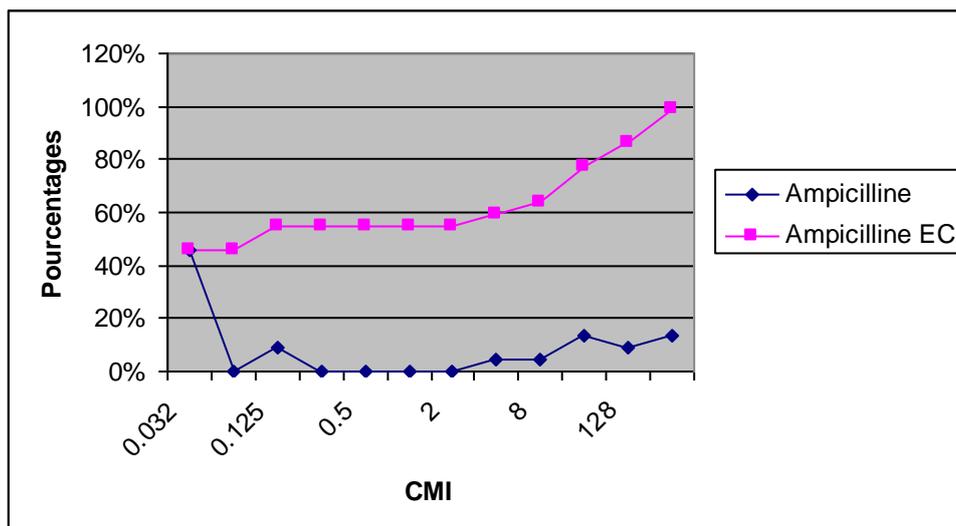
Il est également à noter l'existence d'une souches non productrice de β-lactamases résistante à l'amoxicilline avec la dilution sur gélose.

## **5.2. ACTIVITE DE L'AMPICILLINE**

### **TABLEAU XIII : activité de l'ampicilline sur l'ensemble des souches testées**

#### Résultats des CMI (µg/ml)

Valeurs extrêmes (µg/ml)	≤ 1	1- 4	≥4
Profil	S	I	R
Pourcentage	54,6	0	45.4



**Figure 6** : Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par l'ampicilline .

Parmi les différents antibiotiques testés, l'Ampicilline apparaît comme la moins active sur les souches d'*Haemophilus influenzae* avec un taux de résistance très élevé de 45,4% (presque 50%). En effet en plus des souches productrices de  $\beta$ -lactamases qui se sont révélées résistantes, des souches non productrices de  $\beta$ -lactamases ont également résisté ; ce qui permet de dire que les résistances notées seraient dues à un phénomène autre que la production de  $\beta$ -lactamases.

#### Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

	Valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicilline	1- 4	1.38	170.6

Comme pour l'amoxicilline, l'ampicilline a montré une CMI<sub>90</sub> très élevée (170,6  $\mu\text{g/ml}$ ).

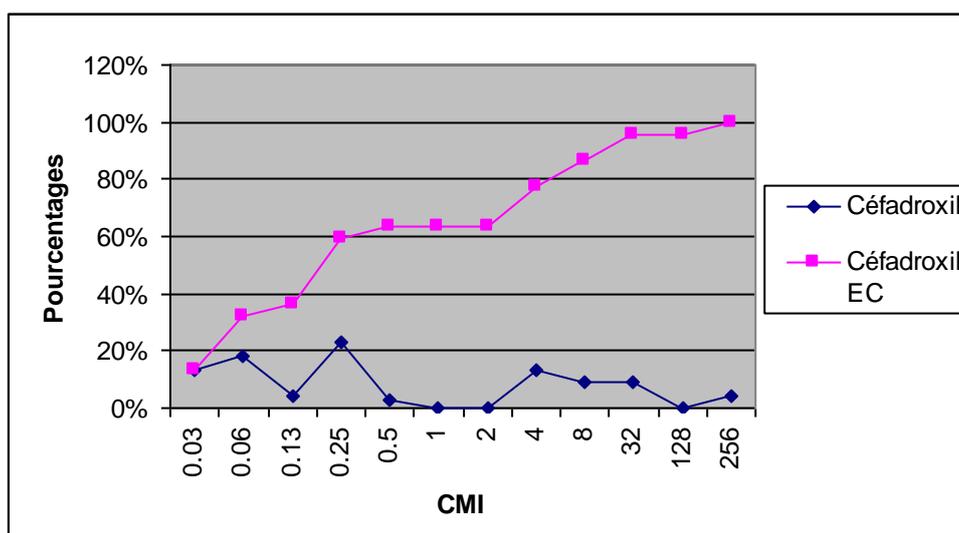
En effet, la CMI<sub>90</sub> de l'ampicilline est largement plus élevée que la valeur limite.

### 5.3. ACTIVITE DU CEFADROXIL

**TABLEAU XIV : activité du céfadroxil sur l'ensemble des souches testées**

Résultats des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )

Valeurs extrêmes ( $\mu\text{g/ml}$ )	$\leq 1$	1- 4	$\geq 4$
Profil	S	I	R
Pourcentage	63.6	13.6	22.8



**Figure 7** : Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par le Céfadroxil.

Le céfadroxil a montré une très bonne activité, mais avec des CMI assez faibles. En effet on constate que 13,60% des souches sont inhibées à 0,032  $\mu\text{g/ml}$ , alors que l'inhibition maximale des souches à savoir 22,8% n'est obtenue qu'à 0,25  $\mu\text{g/ml}$ .

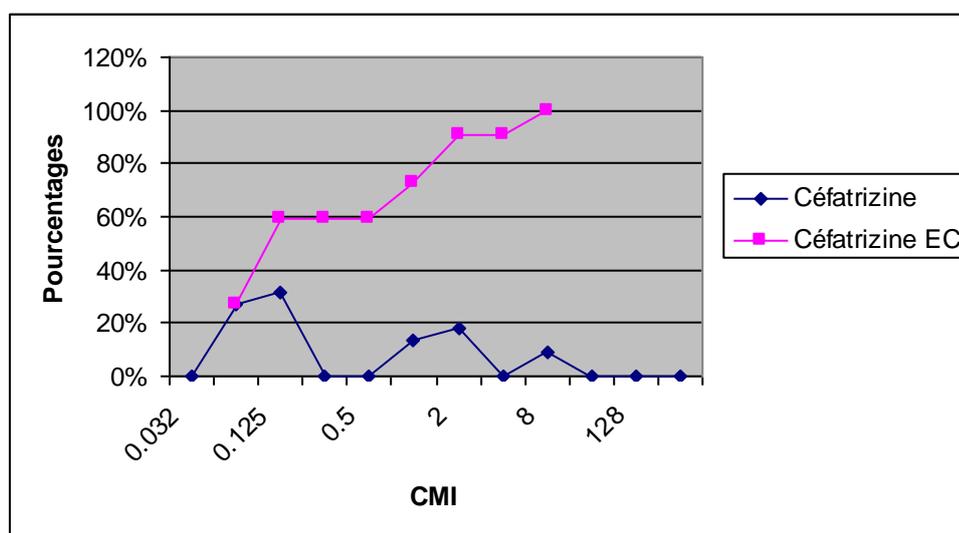
Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

	Valeurs Extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Céfadroxil	1- 4	0,2	24

**5.4. ACTIVITE DE LA CEFATRIZINE****TABLEAU XV : activité de la céfatrizine sur l'ensemble des souches testées**

Résultats des CMI (µg/ml)

Valeurs extrêmes (µg/ml)	≤ 1	1- 4	≥4
Profil	S	I	R
Pourcentage	90.9	0	9.1

**Figure 8 :** Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par la Céfatrizine.

Comme le montre le tableau ci-dessus, la céfatrizine présente une très bonne activité avec 90,9% de souches sensibles, contre seulement 9,1% de souches résistantes.

Il ressort ainsi de ces résultats, la bonne activité de la céfatrizine sur les souches d'*H. influenzae*.

Par ailleurs la figure VII nous montre que les souches commencent à être inhibées à une concentration de 0,032µg/ml, mais l'inhibition du plus grand nombre de souches (31,80%) n'est obtenue qu'à 0.125µg/ml .

Cependant il est noté que la céfatrizine a montré des souches modérément sensibles (31,8%).

#### Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

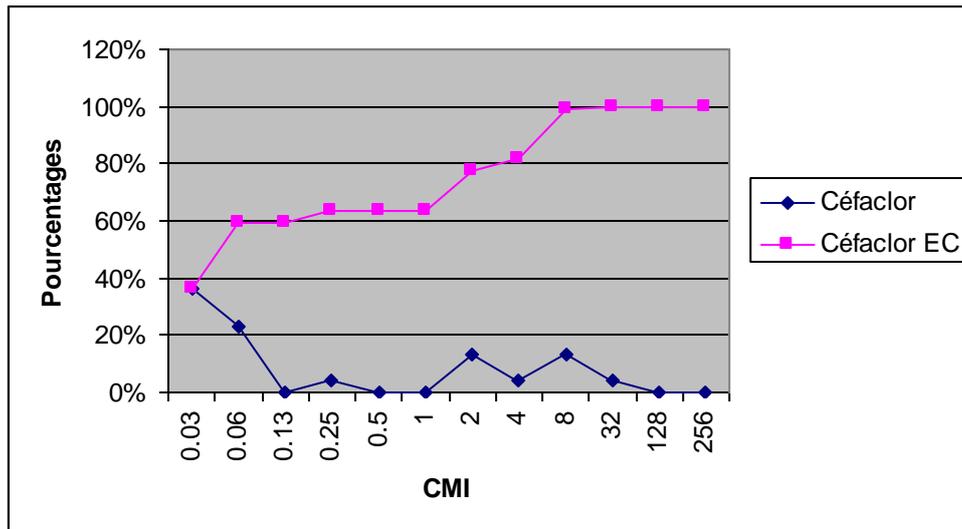
	valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Céfatrizine	1- 4	0.11	5.67

### 5.5. ACTIVITE DU CEFACLOR

**TABLEAU XVI : activité du céfACLOR sur l'ensemble des souches testées**

#### Résultats des CMI (µg/ml)

Valeurs extrêmes (µg/ml)	≤ 1	1- 4	≥4
Profil	S	I	R
Pourcentage	77.2	0	22.8



**Figure 9 :** Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par le Céfaclor.

Avec cet antibiotique plus de 35% des souches sont inhibées à de très faibles concentrations (0,032µg/ml), contrairement à la céfatrizine où le nombre maximal de souches inhibées à savoir 31,8% n'a été obtenu qu'à 0,125µg/ml.

Ce qui prouve sa très grande efficacité contre les souches d'*Haemophilus influenzae*.

Ceci est d'autant plus vrai que nous avons obtenu 77,2% de souches sensibles, contre 22,8% de résistance.

#### Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

	valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Céfacylor	1- 4	0,05	6.6

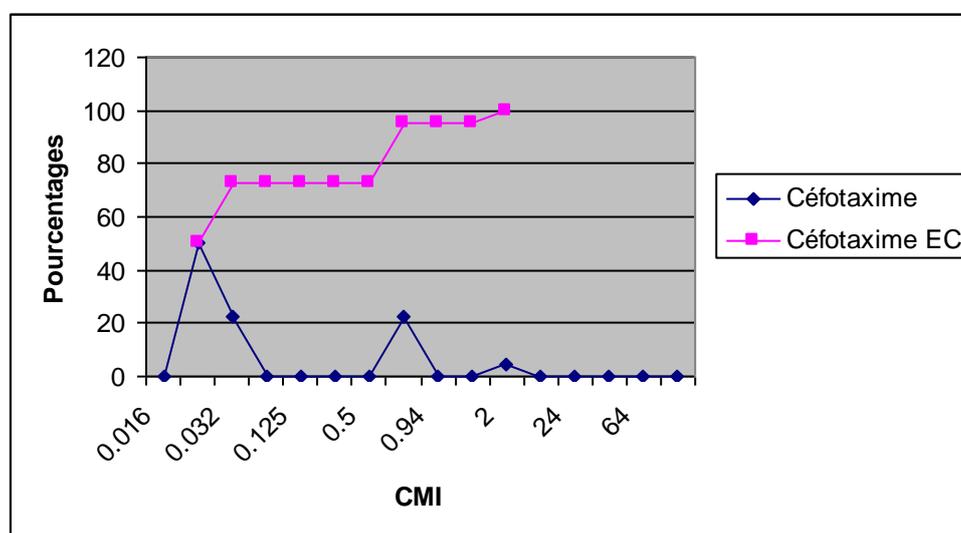
Les résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> montrent que le céfador est très actif sur les souches d'*H. influenzae* testées ; comme le montre la figure VIII, plus de 50% des souches ont été tuées à une concentration de 0,05 µg/ml.

### 5.6. ACTIVITE DU CEFOTAXIME

**TABLEAU XVII : activité de la céfotaxime sur l'ensemble des souches testées**

Résultats des CMI (µg/ml)

Valeurs extrêmes (µg/ml)	≤ 1	1- 4	≥4
Profil	S	I	R
Pourcentage	100	0	0



**Figure 10** : Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par la céfotaxime

La céfotaxime a fait preuve d'une très grande efficacité contre les souches d'*H. influenzae*, avec 100% de souches sensibles dont 50% à des concentrations très basses 0,023µg/ml.

Un début d'inhibition a été obtenu à 0,023 µg/ml et la totalité des souches a été inhibée à une CMI 2µg/ml.

Cependant des souches ont présenté des sensibilités diminuées avec des CMI comprises entre 0,75µg/ml et 2µg/ml.

Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> (µg/ml)

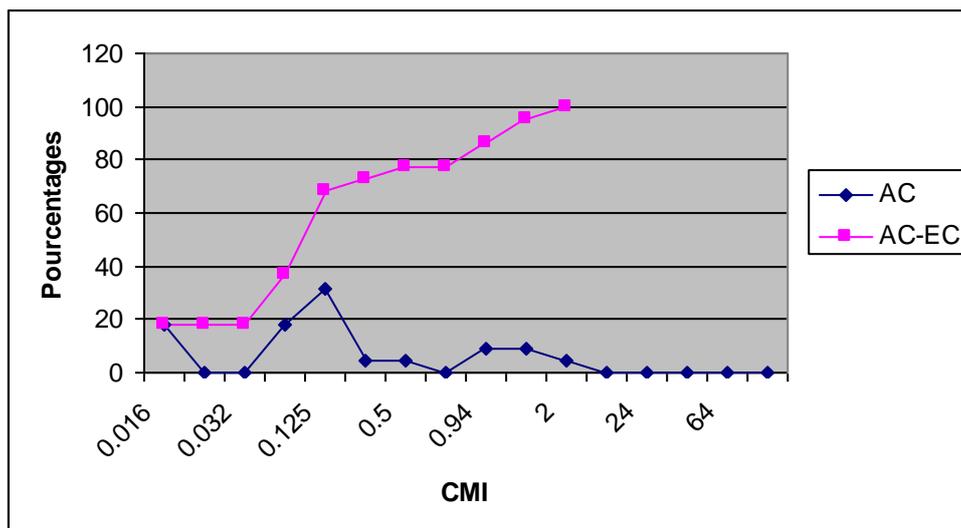
	valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Céfatrizine	1- 4	0.02	0,7

### **5.7. ACTIVITE DE L'ASSOCIATION AMOXICILLINE- ACIDE CLAVULANIQUE**

**TABLEAU XVII : activité de Amoxicilline- acide clavulanique sur  
l'ensemble des souches testées**

Résultats des CMI (µg/ml)

Valeurs extrêmes (µg/ml)	≤ 1	1- 4	≥4
Profil	S	I	R
Pourcentage	95.5	0	4.5



**Figure 11 :** Pourcentages et effectifs cumulés d'inhibition des souches d'*Haemophilus influenzae* par l'association Amoxicilline + acide clavulanique.

L'association amoxicilline +acide clavulanique a fait preuve d'une grande efficacité puisqu'un début d'inhibition a été obtenu à une concentration plus faible que celles des autres molécules à savoir 0,016µg/ml.

Une inhibition totale des souches a été obtenue á 2µg/ml.

De même une seule résistance a été notée.

Les CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont faibles et évocatrices.

#### Résultats des CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>

	valeurs extrêmes	CMI <sub>50</sub> (µg/ml)	CMI <sub>90</sub> (µg/ml)
Amoxicilline + acide clavulanique	1- 4	0,09	0,97

**QUATRIEME PARTIE :**  
**DISCUSSION**

Notre étude a porté sur 22 souches d'*Haemophilus influenzae*. Ces souches isolées ont été identifiées grâce à la technique BBL CRYSTAL N/H, après ensemencement ou repiquage sur gélose au sang cuit polyvitex. Pour chaque souche, 8 antibiotiques ont été testés avec la détermination de leurs CMI, des pourcentages de souches sensibles, intermédiaires et résistantes ainsi que leurs CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub>.

Par ailleurs, la technique de dilution en milieu liquide nous a permis d'évaluer les CMB des antibiotiques mais aussi de pouvoir étudier l'activité bactéricide et bactériostatique de ces molécules.

Ainsi les souches testées ont présenté des sensibilités variables vis à vis de ces différentes molécules. Cette sensibilité est variable selon le groupe, mais aussi selon la méthode utilisée.

En outre, l'activité de ces antibiotiques sur les souches étudiées a révélé des caractères bactéricides et bactériostatiques pour certaines souches parcontre aucune souche tolérante n'a été observée.

Cette discussion portera sur

- le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*H. influenzae* en pourcentage ;
- les résultats des CMB qui ont permis de caractériser la bactéricidie ou la bactériostatie de ces  $\beta$ -lactamines
- la thérapeutique idéale à mettre en oeuvre en cas d'infection par le germe *H. influenzae*.

## 1. PRODUCTION DE $\beta$ -LACTAMASES

Contrairement aux résultats trouvés sur des études menées au Sénégal par EZIN en 1994 (36), HERIODIAS en 1996 (41) et ZAOUÏ en 1998 (76), à savoir l'absence (0%) de souches productrices de  $\beta$ -lactamases, notre étude a montré 36.4% de souches sécrétrices de  $\beta$ -lactamases. Cette augmentation du nombre de souches productrices de  $\beta$ -lactamases, a été notée dans plusieurs études comme celles de FUSHS qui sur 206 souches d'*H. influenzae* testées, a trouvé 61 souches  $\beta$ -lactamases positives soit 29,61% (37).

Une surveillance multicentrique de la résistance aux antibiotiques de plusieurs souches dont *Haemophilus influenzae* (*Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella*) de 1998 à 1999 à Taiwan par HSUEH et coll., a trouvé des taux très élevés de sécrétions de  $\beta$ -lactamases entraînant la plupart des échecs thérapeutiques dans les infections respiratoires en particulier. En effet, sur 301 souches étudiées, 56% sont *Haemophilus influenzae*  $\beta$ -lactamases positives (42).

KARLOWSKY et coll. aux USA en 2001 ont également trouvé un taux assez importants de souches d'*Haemophilus influenzae* sécrétrices de  $\beta$ -lactamases : 28,3% soit 406 souches sur 1434 (44).

EDOH et coll. ont trouvé à Treichville en 2001, 39,9% de souches  $\beta$ -lactamases positives (35).

De même, CRITCHLEY et coll. en 2001, ont eu sur 2614, 847 souches productrices de  $\beta$ -lactamases soit 36,4% (23).

Tous ces résultats montrent une nette augmentation du nombre de souches d'*Haemophilus influenzae* sécrétrices de  $\beta$ -lactamases au file des années.

## **2. ETUDE COMPARATIVE DES DEUX METHODES UTILISEES AU NIVEAU DE L'AMOXICILLINE**

Considérée comme la technique de référence, la dilution en milieu gélosé paraît simple ; mais elle est en réalité soumise à de nombreux facteurs dont les variations peuvent mettre en cause la validité des résultats. A contrario la dilution en milieu gélosé, le E-test nous a permis d'obtenir rapidement et de simplement une détermination des CMI, et de tester simultanément plusieurs antibiotiques.

Les résultats de l'amoxicilline, obtenus après diffusion sur gélose (E-test), sont comparables à ceux obtenus après dilution, même si avec cette dernière la CMI<sub>50</sub> est plus élevée.

Les taux de résistances obtenus avec les deux méthodes sont presque égaux, 36.4% pour le E-test et 40.9% pour la dilution.

Cependant une souche sensible avec le E-test est retrouvée résistante avec la dilution sur gélose. Cette résistance est sûrement due à une erreur de manipulation survenue soit lors de la préparation de la solution mère, soit lors de l'incorporation de l'antibiotique dans la gélose (la dilution au 20<sup>ème</sup> n'a pas été respectée).

Ce résultat montre à quel point le E-test est simple par rapport à la dilution sur gélose, car ne nécessitant pas toutes ces manipulations.

### 3. PROFIL DE SENSIBILITE AUX $\beta$ -LACTAMINES DES SOUCHES D'*HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

#### 3.1. SENSIBILITE A L'AMPICILLINE

L'ampicilline apparait comme l'antibiotique le moins efficace sur les souches d'*H. influenzae* avec près de 45,6% de résistances avec des CMI<sub>50</sub> égales à 1,38mcg/ml et des CMI<sub>90</sub> très élevées, de l'ordre de 170,6mcg/ml.

En effet, en plus des souches productrices de  $\beta$ -lactamases qui se sont révélées résistantes, deux souches d'*H. influenzae* non productrices de  $\beta$ -lactamases ont été aussi résistantes à l'ampicilline. Il serait donc intéressant de chercher à déterminer l'origine de cette résistance qui pourrait être due à la production d'une enzyme autre que les  $\beta$ -lactamases plasmidiques, ou à d'autres mécanismes.

WADJI abonde dans le même sens, et pense que le pourcentage non négligeable de souches résistantes, chez lesquelles une  $\beta$ -lactamase plasmidique n'a pas été détectée, incrimine d'autres mécanismes de résistance à savoir la sécrétion d'enzymes autres que les  $\beta$ -lactamases plasmidiques, l'altération des cibles membranaires ou la modification des PLP. (75)

Nos résultats ont également montré que les taux de résistance trouvés par rapport à l'ampicilline étaient presque égaux à ceux de l'amoxicilline étant entendu que nos souches ont confirmé la résistance naturelle à cette dernière molécule citée.

HSUEH et coll. dans leur étude sur la résistance aux antibiotiques à Taiwan, ont montré que sur 301 souches d'*H. influenzae*, 5 souches (1.7%) étaient non productrices de  $\beta$ -lactamases mais résistantes à l'ampicilline. Cette

même étude fut la première à montrer, une résistance à l'amoxicilline sans production de  $\beta$ -lactamases (42).

EDOH et coll. ont trouvé une résistance très élevée à l'ampicilline dans leur étude menée sur les méningites à *Haemophilus* au CHU de Treichville en 2001 (35).

KARLOWSKY et coll. ont détecté aux USA en 2001 9 souches d'*H. influenzae* (soit 0.6%)  $\beta$ -lactamases négative résistantes à l'ampicilline (BLNAR) (44). Les CMI de l'ampicilline pour toutes ces souches, étaient de 4mcg/ml. Ce qui confirme nos résultats ( 4mcg/ml et 8mcg/ml pour nos deux souches résistantes à l'ampicilline et non productrices de  $\beta$ -lactamases). CRITCHLEY et coll. ont eu les mêmes résultats (23).

Ceci montre que les souches d'*H. influenzae* sont de plus en plus productrices de  $\beta$ -lactamases, ce qui fait que l'amoxicilline et l'ampicilline deviennent moins efficaces avec respectivement 40,9% et 45,4% de résistance.

Les souches d'*H. influenzae*, isolées par notre étude, ne présenteraient-elles pas aussi une résistance naturelle à l'ampicilline ?

### **3.2. SENSIBILITE A L'AMOXICILLINE**

Avec l'amoxicilline, nous avons obtenu près de 45% de résistance avec des CMI<sub>90</sub> assez élevées, supérieures aux valeurs critiques.

Cependant il est à noter que cette résistance n'est visible que sur les souches productrices de  $\beta$ -lactamases.

En effet, ces souches  $\beta$ -lactamases positives sont très résistantes à l'amoxicilline comme nous l'avons constaté avec les études de DOERN G.V (31).

Par ailleurs, la sensibilité à l'amoxicilline sur les souches non productrices de  $\beta$ -lactamases est très bonne. Ces résultats concordent avec ceux de ZAOUI (76) et EZIN (36) et de HERIODIAS (41) lors d'études menées au CHU Le DANTEC.

Nos travaux ont permis d'apprécier la résistance naturelle des souches d'*H. influenzae* à l'amoxicilline comme décrit dans la littérature. Cette résistance est la conséquence de la production de  $\beta$ -lactamases par ces souches. Cette production de  $\beta$ -lactamases a été déterminée par la méthode de la céfinase. Plusieurs auteurs ont utilisé la même méthode et ont reconnu la prédominance de ce mécanisme dans la résistance bactérienne aux antibiotiques (1,10).

De même THABAUT en 1987, avait trouvé que cette résistance naturelle à l'amoxicilline, concernait 5 à 10% des souches. Ce même auteur donne un taux de 20% en Afrique du sud. Ces mêmes chiffres ont été obtenus en Europe et en Espagne.

Les résistances les plus élevées notées dans notre étude sont le fait de souches non productrices de  $\beta$ -lactamases (4,5%). Ces résultats sont comparables à ceux de l'étude Taiwanaise (42) qui fut la première à montrer, une résistance à l'amoxicilline sans production de  $\beta$ -lactamases mais également CRITCHLEY et coll. aux USA ont montré que l'amoxicilline ne pouvait être utilisée en première intention dans les infections à *H. influenzae* à cause du taux élevé de sécrétion de  $\beta$ -lactamases (23).

### **3.3. SENSIBILITE A L'AMOXICILLINE +ACIDE CLAVULANIQUE**

Cette résistance naturelle à l'amoxicilline seule, fait que l'association de cet antibiotique avec une autre molécule ayant plus d'affinité pour les  $\beta$ -lactamases, a été introduite.

L'efficacité de cette association est confirmée par nos résultats, avec 95.5% de sensibilité des souches d'*H. influenzae* à l'association amoxicilline+acide clavulanique contre 59,1% de sensibilité pour l'amoxicilline seule.

Comme le confirme la littérature la plupart des souches sécrétrices de  $\beta$ -lactamases résistantes à l'amoxicilline sont sensibles à l'association précitée, c'est le cas de l'étude menée par KARLOWSKY et coll. qui avaient trouvé 9 souches  $\beta$ -lactamases positives, résistantes à l'amoxicilline mais toutes sensibles à l'association amoxicilline+acide clavulanique (44).

Ces mêmes auteurs ont montré une résistance à cette association amoxicilline+acide clavulanique avec des souches sécrétrices de  $\beta$ -lactamases appelées BLPACR ; comme le confirme notre étude avec une souche BLPACR (44).

La résistance obtenue avec cette association, traduit soit une sécrétion par les souches de  $\beta$ -lactamases non inhibables par l'acide clavulanique, soit tout simplement la présence d'une résistance non induite par les  $\beta$ -lactamases.

Des études plus approfondies devraient nous permettre d'élucider ce mécanisme.

### **3.4. SENSIBILITE AU CEFADROXIL**

De toutes les céphalosporines testées, le céfadroxil s'est montré le moins actif avec 22,8% de souches résistantes, 13,6% de souches intermédiaires et 63,6% de souches sensibles.

Nos résultats viennent s'opposer aux résultats cliniques obtenus en 1996 par PORTIER et coll., lors d'une étude épidémiologique qui comparait l'efficacité du céfadroxil à celle de la céfatrizine.

En effet cette étude avait trouvé un taux de succès de 88,1% pour la céfatrizine et 89,8% pour la céfadroxil (62).

Même si le pourcentage de sensibilité du céfadroxil est supérieur à 50% comme celui trouvé par PORTIER, il n'en demeure pas moins que les pourcentages de souches résistantes et intermédiaires doivent être pris en compte. Cette augmentation du pourcentage de résistance trouvée avec les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération, ne serait-elle pas liée à une hausse du nombre de souches d'*H. influenzae* sécrétrices de  $\beta$ -lactamases, retrouvée dans plusieurs études parmi lesquelles la notre ?

### **3.5. SENSIBILITE A LA CEFATRIZINE**

La céfatrizine a donné une très bonne sensibilité avec une résistance pratiquement nulle : seulement 2 souches parmi les 22.

Des études menées par CAMUGUET et coll., en Mai 1992 sur 73 souches d'*H. influenzae* ont montré une très bonne activité de la céfatrizine avec 0% de résistance.

Une autre étude menée à l'Institut Pasteur de Bradant, sur les souches d'*H. influenzae* a donné des  $CMI_{90}=2,14\mu\text{g/ml}$ .

Par ailleurs, LEITNER et coll. en 1982 ont trouvé des  $CMI_{90}$  et des  $CMI_{50}$  respectivement égales à 1,8 et 3,36.

Même si notre étude a donnée une  $CMI_{90} = 5,67$ , il demeure néanmoins que la céfatrizine reste une molécule efficace sur les souches d'*H. influenzae* avec une  $CMI_{50}=0,11\mu\text{g/ml}$

Nos résultats ont montré 90,9% de sensibilité, ce qui confirme les résultats cliniques obtenus par DAUKENBERG, en 1994 lors d'une étude multicentrique qui a observé dans le groupe céfatrizine, 85,1% de guérison.

De même, une autre étude menée par PORTIER et coll. en 1996 chez 303 enfants, a montré des taux de 88,1% (62).

### **3.6. SENSIBILITE AU CEFACLOR**

Le céfaclor a inhibé 77,7% de nos souches. Ce taux confirme celui obtenu en 1995 par DAGAN, qui dans son étude a montré que le Céfaclor éradiquait 70% des cas d'infections à *H. influenzae* (27).

Ce dernier résultat a été obtenu au cours d'une étude sur l'activité des céphalosporines orales lors du traitement des otites moyennes aiguës. Les résultats obtenus par notre étude au laboratoire confirment l'efficacité de cette molécule sur *H. influenzae*, même si 28,8% et 13,6% de souches résistantes et intermédiaires ont été trouvées.

### **3.7. SENSIBILITE A LA CEFOTAXIME**

De toutes les céphalosporines testées, la Céfotaxime a donné les meilleurs résultats avec 100% de souches sensibles avec des CMI basses allant de 0.023 à 0.064 µg/ml.

Ces résultats viennent confirmer les résultats théoriques des études menées par DAGNRA, AKOUA qui attestent que les souches d'*H. influenzae* sont plus sensibles aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération (28, 4). Le fait que nous n'ayons pas eu de résistance confirme l'efficacité de cette génération d'antibiotiques ; même les souches productrices de β-lactamases ont été sensibles à cet antibiotique.

Ces mêmes résultats ont été trouvés dans les études de SY en 1996 et ZAOUI en 1998 qui ont montré une excellente activité de la céfotaxime avec 100% de sensibilité (69, 76).

## **4. ETUDE BACTERICIDIQUE ET BACTERIOSTATIQUE DES SOUCHES D'HAEMOPHILUS INFLUENZAE**

Cette étude de l'effet bactéricide n'a été étudiée que sur 5 antibiotiques appartenant à la famille des β-lactamines. Ceci nous a permis de voir que les β-lactamines avaient un très bon effet bactéricide sur toutes les souches

d'*H. influenzae*, avec une excellente répartition des rapports CMB/CMI compris entre 1 et 2 dans la majorité des cas.

Nos résultats sont en parfaite concordance avec le tableau de classification de BERCHE ( 8 ).

**TABLEAU XIX : Classification des Antibiotiques selon leur activité in vitro**

Bactéricides	Bactériostatiques
β-lactamines	Phénicolés
Vancomycine	Tétracyclines
Fosfomycine	Macrolides et lincosamides
Aminosides	Acide fusidique
Streptogramines	Sulfamides
Sulfamides + Triméthoprime	Nitrofurannes
Quinolones	
Rifampicines	
Nito-imidazolés	
Polymicines	

En effet l'activité antibactérienne des β-lactamines, réside dans l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane constituant la paroi des bactéries par fixation élective sur les cibles enzymatiques de la membrane cytoplasmique appelées «PLP : protéines de liaison aux pénicillines».

Pour les aminopénicillines, nous avons obtenu des effets bactéricides à plus de 90% des souches, sauf pour l'ampicilline qui n'a donné que 72,7%, du fait certainement des taux de résistance des souches d' *H. influenzae* de plus en plus notés avec cette molécule.

Même si leur caractère bactéricidique reste comparable, le pourcentage de bacteriostatie est plus élevé pour l'ampicilline(27,8%) que pour l'amoxicilline 9,1%.

Quant aux céphalosporines étudiées, elles ont, toutes catégories confondues, une activité bactéricide sur l'ensemble de nos souches.

Cependant, malgré une bonne bactéricidie, celles de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> génération restent plus efficaces que les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération comme l'avaient montré leurs CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> (voir tableau V).

# CONCLUSION

Si les bactéries font partie intégrante de notre vie, et peuvent avoir de multiples fonctions métaboliques, de défense non spécifique de l'organisme, des bactéries à pouvoir pathogène, spécifique ou opportuniste, peuvent créer des manifestations pathologiques.

Il en est ainsi du germe *Haemophilus influenzae* qui fait partie de la flore normale des muqueuses des voies respiratoires supérieures,( retrouvé aussi quelques rares fois dans le tube digestif )mais qui peut être responsable d'infections de la sphère ORL, telles que sinusites, otites, conjonctivites, épiglottes, d'infections pulmonaires mais aussi d'infections septicémiques survenant surtout chez l'enfant entre 3 mois et 3 ans et chez l'adulte présentant un terrain particulier (sujet âgé, diabétique, alcoolique). La dissémination systémique s'accompagne d'une fièvre élevée et des localisations métastatiques, dont la plus fréquente est la méningite qui peut entraîner une mort brutale par choc septique.

Il convient alors de l'identifier et de l'éradiquer en respectant au maximum les flores commensales associées.

C'est ainsi que les examens du laboratoire de bactériologie (**Micro CSB system**) nous ont permis d'obtenir un tel résultat, et ont ainsi aidé au diagnostic et au traitement de ces maladies infectieuses dont il est la cause..

En effet le succès ou l'échec d'une antibiothérapie n'est pas entièrement prévisible dans certains types d'infections et le rôle du laboratoire de bactériologie devient essentiel dans le choix des antibiotiques les plus actifs et l'élimination des antibiotiques les moins actifs.

Ainsi le laboratoire, en identifiant la souche responsable grâce aux méthodes habituelles de cultures sur milieux usuels ( Géllose de Sang cuit + polyvitex ), d'identification des colonies à l'œil nu, puis en tenant compte de la morphologie du germe ,étudiée grâce à l'état frais et la coloration de Gram ; et

enfin avec l'aide des caractères biochimiques ( catalase, oxydase et API BBL crystal ), nous a permis d'avoir toutes les informations nécessaires à l'étude de ces souches d' *H. influenzae*.

Mais pour l'efficacité des  $\beta$ -lactamines sur ces souches d'*H. influenzae*, deux méthodes de détermination nous ont permis d'étudier cette sensibilité des souches d'*H. influenzae*, il s'agit de la diffusion sur gélose (**E-test**) qui a présenté des avantages certains par rapport à la dilution en milieu gélosé.

En effet, c'est une méthode directe de quantification de l'activité antibactérienne d'un antibiotique ne nécessitant pas de tableaux d'interprétation du fait des gradients de concentrations, illustrée par une bonne reproductibilité des résultats avec des variations minimales liées à la densité de l'inoculum bactérien et aux phases de croissance .

Contrairement à la diffusion en milieu gélosé qui est une méthode très rapide de détermination des CMI, la dilution en milieu gélosé nécessite non seulement un temps très long et des conditions rigoureuses de préparation, mais aussi un appareil très performant.

Ainsi par ces deux méthodes de dilution et de diffusion sur gélose, nous avons déterminé avec précision les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 22 souches d'*H. influenzae*.

Les antibiotiques les plus efficaces ont été la céfotaxime, qui inhibe 100% de nos souches, suivie de l'association Amoxicilline-acide clavulanique 95,5%, de la céfatrizine 90,9%, du céfaochlor 77,7%, du céfadroxil 63,6% ; viennent ensuite les aminopénicillines amoxicilline et ampicilline avec des activités légèrement supérieures à la moyenne (59,1% et 54,6%).

Les CMI<sub>90</sub> les plus élevées ont été notées avec ces deux derniers antibiotiques (170,6 µg/ml).

Ces résultats nous ont montré une très bonne activité des β-lactamines sur les souches d'*H. influenzae* en générale mais plus particulièrement sur les souches non productrices de β-lactamases, car pour les souches productrices de β-lactamases ne sont efficaces que les céphalosporines de 2<sup>ème</sup>, de 3<sup>ème</sup> génération et l'association amoxicilline-acide clavulanique qui ont donné de très bons résultats avec plus de 90% de souches sensibles .

Nous avons noté également que les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération représentées ici par le céfadroxil résistent mal à l'action des β-lactamases, en effet toutes les souches productrices de β-lactamases se sont révélées soit résistantes soit intermédiaires, mais jamais sensibles.(22,8%, 13,6%)

Pour l'étude des concentrations minimales bactéricides, une méthode particulière a été utilisée, il s'agit de la dilution en milieu liquide, méthode qui nous a permis de voir que la plupart des β-lactamines avaient un effet bactéricide même si quelques unes ont donné des effets bactériostatiques.

Il ressort de cette étude que le traitement des infections à *H. influenzae* n'est pas chose aisée et toute souche isolée et considérée comme responsable d'infection devrait faire l'objet d'un antibiogramme seul garant d'un traitement efficace et rapide, comme l'ont montré ces deux méthodes de détermination de la sensibilité aux β-lactamines, et qui nous ont permis de voir que les résistances des souches d'*H. influenzae* aux β-lactamines sont en nette progression dans notre pays.

Et d'après les fortes résistances notées avec l'ampicilline, il serait vraiment souhaitable que des études plus approfondies soient menées au laboratoire pour déterminer si l'ampicilline peut toujours être utilisée dans le traitement de 1<sup>ère</sup> intention des infections dues à ce germe.

Ainsi toutes ces informations qui ressortent de notre étude nous ont permis de donner quelques recommandations pour le traitement des infections à *H. influenzae*.

- Pour les infections non invasives, on peut utiliser l'association amoxicilline + acide clavulanique, mais aussi les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération peuvent y trouver leur indication.
- Concernant les infections septicémiques : du fait de la fréquence des souches productrices de  $\beta$ -lactamase et de la gravité des formes invasives, imposent d'utiliser d'emblée une céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération chez les enfants, (et chez les adultes ) et une association amoxicilline + acide clavulanique. ou céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération chez l'adulte.

# **BIBLIOGRAPHIES**

- 1     **ACAR J.F., BOUANCHAD D.H., BUU HOI A.**  
Résistance bactérienne aux antibiotiques.  
*Bactériologie. Med, Flam, Med Sc, 1982, 2e Ed: 213- 224*
  
- 2     **ACTOR P., URI J.V., PHILLIPS L., COLI.**  
Laboratory studies with Cefatrizine (SKF 60771) a new broad-spectrum orally-active cephalosporine.  
*J antibiot. (TOKIO) 1975, 28, N°8, 594-601.*
  
- 3     **AFECT**  
Traité de clinique thérapeutique Vol2  
Médicaments antibiotiques  
*Paris édition 1992 : 499p.*
  
- 4     **AKOUA KOFFI C., ANGHUI H., FAYE-KETTE H., EHOLIE S., TRIMITE M., DOSSO M., KODIO A.**  
Aspects bactériologiques des méningites purulentes au CHU de Youpouguon 1995-1998.  
*Méd. Mal. Infect. 2001 ; 31 : 475-481.*
  
- 5     **AVRIL JL., DABERNAT H., DENIS F.,MONTEIL H.**  
Bactériologie clinique, 2ème édition,  
*Paris, Elipse, 1992 : 511p, PP 55-65.*
  
- 6     **BAKER C.N., THORNSBERRY C., JONES R.N.**  
Antimicrobial activity of cefapérazone, céfotaxime, moxalactam, mezlocilline, and other  $\beta$ -lactames antibiotics against *Nesseria gonorrhoeae* and *H. Influenzae* including  $\beta$ -lactamases producing strains.
  
- 7     **BARTMAN T.**  
In vitro Activity of cefaclor against *Haemophilus* in comparison to cefalexin, cephradine, cefadroxil, cefatrizin and ampicillin.  
*Infect. 1981:9; n 4:186-190.*
  
- 8     **BERCHE P.**  
*Haemophilus influenzae* et espèces bactériennes apparentés.  
In LE MINOR L., VERON M.  
*Bactériologie Médicale, Paris Flammarion Méd : Science, 1982 : 347-353.*

- 9 BERGONE BEREDIN C.**  
Antibiotiques antibactériens : classification, principes et règles d'utilisation.  
*Rev. Prot. 1998 : 991-999*
- 10 BINGEN E.**  
Différents mécanismes de défense de l'organisme.  
In : « Mécanisme d'action des bêta-lactamines de la structure bactérienne à la structure de la molécule.  
*Nice : Laboratoire Roussel, 1986, 32-45.*
- 11 BINGER E., LAMBERT-ZECHVOSKY N., PROUX M.C., BINGEN-BIDOIS M.**  
Détermination des biotypes du genre *Haemophilus* et étude de la sensibilité à l'ampicilline en pratique hospitalière  
Etude de 500 souches.  
*Ann. Biol. Clin. 1982 ; 40 : 597-662.*
- 12 BOUVET A., LE PENNEC M.P.**  
Les  $\beta$ -lactamines : Mécanismes d'action et de résistance.  
*Rev. Prot. 1997, 27, N°23, 2761-2773.*
- 13 BUXERAUD J., COMBY F.**  
Antibiothérapie : classification des antibiotiques.  
*actu. Pharma. 1995, 337 : 35-41.*
- 14 CAILLON J.**  
L'activité bactéricide des antibiotiques, développement de nouvelles méthodes automatiques et leurs applications dans l'étude des antibiotiques seuls ou associés.  
*Th. microbiol. Paris : 1990, 238p, N°153.*
- 15 CAMUGUET J.**  
Epidémiologie bactérienne des otites moyennes aiguës et sensibilité aux antibiotiques. Etude régionale.  
*Infect : N° special, 1992, 15-16.*
- 16 CAMPOS J., GARCIA-THORNEL S., SANFELIU I.**  
Susceptibility studies of multiply resistant *Haemophilus influenzae* isolated from pediatric patients and contacts.  
*Antimicrob. Agents Chemother. 1984; 25 : 706-709.*

- 17 CARBONNELLE B., DENIS F., MARMONIER A., PINON G., VARGES R.**  
Bactériologie médicale : Techniques usuelles.  
*Paris : SIMEP SA. pp 125-126.*
- 18 CARPOS J.M., Jn MURAY P.R., BARON E.J., PFOLLER M.A., TENOVA F.C., YOLKEN R.H.**  
*Haemophilus*  
Manuel of clinical microbiol.  
*7<sup>th</sup> ed. ASM. Press, Washington DC, 1999, p 539*
- 19 CHABBERT Y.A.**  
L'antibiogramme, sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques.  
*La Tournelle, éd, St. Mandé, 1963, 237p.*
- 20 CHAUBBERT YA.**  
Les antibiotiques en bactériologie médicale.  
Dans danget GL. : Techniques en bactériologie.  
*Vol3, Paris, Flammarion. Médecine Science, 1972 : 143-242.*
- 21 COHENI R., DABERNAT H., VARON E., BINGEN E., GESLIB P.**  
Résistance des *Haemophilus influenzae*, responsable des infections des voies respiratoires basses.  
*Méd. Mal. Infect. 1992 ; N° spécial 22: 87-94.*
- 22 COURVALIN P., DRUGEON H., FLANDROIS J.P., GOLDSTEIN F.**  
Bactéricidie.  
*Paris : Maloine, 1990 : 374p.*
- 23 CRITCHLEY IAN A.,KARLOWSKY J.A.,DRAGHI D.C.,JONES M.E.,THORNSBERRY C.,MURFITT K.,SAHM D.F.**  
Activities of Foxopenem an oral betalactam against recent US isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.  
*AAC Vol 46, N°2, february 2002; 550-555.*
- 24 DABERMAT H., DELMAS C., LARENG MB.**  
Prévalence de la résistance aux antibiotiques des *Haemophilus influenzae* isolés en France un an d'activité du réseau de surveillance des infections à *H. influenzae*.  
*Pathol. Biol. 1986 ; 34, 372-378.*

- 25 DABERMAT H., SANSON-LE-PORS M.J.**  
*Haemophilus*  
 In LE MINOR L, VERON M.  
*Bactériologie médicale. Paris : Flammarion. médecine Sciences 1990 ; 521-533.*
- 26 DABERMAT H., SEGHY M., DELMAS C., LARENG C.**  
 Situation en 1993 de la résistance aux antibiotiques chez *Haemophilus influenzae* en France (bilan du centre de référence pour *Haemophilus influenzae*).  
*Méd. Mal. Infect. 1994 ; 24, 1244-1247.*
- 27 DAGAN R., ABRAMSON O., LEIBOVITZ E., LANG R., GOSHEN S., GREENBERG D., YAGUPSKY P., LEYBERMAN A., FLISS D.M.**  
 Impaired bacteriologic response to oral cephalosporins in acute otitis média caused by interne diately penicillin-resistant pneumococci.  
 35<sup>th</sup>. Interscience conference on Antimicrob. Agent and *Chemother, 1995, Abst LB25.*
- 28 DAGNRA AY., TIGOSSON S., PRINCE DAVID M.**  
 Prévalence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées des méningites.  
*Méd. Mal. Infect. 2000; 30 291-294.*
- 29 DAUTZENBERG B.**  
 Une étude multicentrique :céfatrizine versus l'association amoxicilline+acide clavulanique.  
*Actua. Ther. Européenne, 1994, N°152, 1-5.*
- 30 DOERN G.V.and the Alexender Project collaborative Group.**  
 Antimicrobiol resistance among lowees respiratory tract Isolates of: results of 1992-1993  
 Western Europe and USA collaborative surveillance study.  
*J. Antimicrob. Chemother ; 1996, 38 suppl. A: 59-69.*
- 31 DOERN GV., BRUEGGEMANN AB., PIERCE G., HOLLEY AP., RAUCH A.**  
 Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of  $\beta$ -lactamase positive strains resitant amoxicilline+clavulamate.  
*1997, 41: 292-297.*

- 32 DOERN GV., JORGENSEN JH., THORNSBERRY C., PRESTON DA.**  
Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* : a collaborative study.  
*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1986; 4, 95-107.
- 33 DUBLANCHET A., PETIT JC.**  
Résultats de l'enquête multicentrique concernant l'identification des *Haemophilus*.  
*Pathol. Biol.* 1983 ; 31, 97-101.
- 34 DUPONT B.**  
 $\beta$ -lactamines.  
*Encycl. Méd. Chir. Paris Mal. Infect.* 2-1976, 8004 C-10.
- 35 EDOH V., TIA H., OULAI M., BOKA B.**  
Aspects bactériologiques des méningites dues à *Haemophilus influenzae* chez l'enfant.  
*Bull. Soc. Pathol. Exot*, 2001, 94, 4, 293-295.
- 36 EZIN J.**  
Etude des caractères phénotypiques des souches d'*Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* isolées à Dakar .  
*Th. Pharm.: Dakar*, 1994; 77.
- 37 FUCHS P.C., BARRY A.L., BROWN S.D.**  
Influence of variations in test methods on susceptibility of *Haemophilus influenzae* to Ampicillin, Azithromycin, Clarithromycin and Telithromycin.  
*JCM*, Vol. N°1, January 2001, p 43 46.
- 38 GÉHANNO P., COHEN R., BARRY B.**  
Otitis moyennes aiguës : une antibiothérapie est-elle nécessaire? Laquelle en première intention ? Pour quelle durée ?  
*Méd. Mal. Infect.* 1997,27. Spécial :397-407.
- 39 GRANOFF DM., WARD J.M.**  
Current status of prophylaxis for *Haemophilus influenzae* infections.  
In : Current clinical topics in infectious diseases.  
*New York: MC GRAW HILL*, 1984: 290-315

- 40 HANDZERGER S., TOMAZ A.**  
Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria.  
*Rev. Infect. Dis.* 1985; 7: 368- 386.
- 41 HERIODIAS N.D.H.**  
Détermination de la sensibilité des souches d'*Haemophilus influenzae* par E-test et étude de la variation de la sensibilité à l'association Amoxicilline-acide clavulanique.  
*Th., Pharm., : Dakar, 1996 ;56.*
- 42 HSUEH P.R.,LIU Y.C.,SHYR J.M.,WU T.L.,YAN J.L.,WU J.,LEU H.S.,CHUANG Y.C.,LAU Y.J.,LUH K.T.**  
Multicenter surveillance of antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in Taiwan during the 1998 1999. Respiratory season.  
*AAC*, Vol. 44, N°5, May 2000; p 1342-1345.
- 43 HUMBERT G., LEROY A.**  
Les céphalosporines.  
*Rev. Prat.* 1977; 27; N° 43; 2817- 2833.
- 44 KARLOWSKY J.A., CRITCHLEY IAN A.,BLOSSER-MIDDLEYTON R.S., KARGINOVA E.A.,JONES M.E., THORNSBERRY C.,SAHM F.D.**  
Antimicrobiol surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a betalactmase negative and ampicillin resistant strain.  
*JCM*,Vol. 40 ; N°3 ; 2002, p 1063-1066.
- 45 KIBSEY C.P., RENNIE R.P., RUSHION J.E.**  
Disk diffusion versusbroth microdilution susceptibility Cridelines of the National Commitee for Laboratory Standards.  
*J. Clin. Microb*, 1994, 32, 2786-2790.
- 46 KILIAN M.**  
A taxonomie study of *Haemophilus influenzae* with the proposal of a new species.  
*J. Gen. Microbiol.* 1976; 33: 9-62.
- 47 KOSMIDIS J., WILLIAMS J.D., ANDREWS J. and al.**  
Amoxycillin pharmacology, bacteriology and clinical studies.  
*Bact. J. Clin. Pract.* 1972 ; 26 : 341-346.

- 48 LEITNER H.**  
Activité de la céfalexine, du céfaclor, et de la céfatrizine sur *Haemophilus influenzae*.  
In: Activité antibactérienne in vitro de la céfatrizine.  
JAMA, 1990.(Suppl, Janvier), 9-10.
- 49 MALAN C.**  
Résistance bactérienne aux antibiotiques.  
*Concours Med. 1996 ; 118 : p440.*
- 50 MOUNTEN LH.**  
Résistance bactérienne et antibiotiques.  
*Méd. Mal. Infect. 1995 : 25 ; 9-19.*
- 51 MURPHY TH., APICELLA MA.**  
Non typable *Haemophilus influenzae* type b : a review of clinical aspects ; surface and the human immune response to infection.  
*Rev. Infect. Dis. 1987; 9 ; 1-15.*
- 52 NASSIF X.**  
Facteurs de virulence de *Haemophilus influenzae* responsable d'otites aiguës de l'enfant.  
*Lettre Infect. 1994; 9 suppl. 18: 26- 29.*
- 53 NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards) Methods for dilution antimicrobiol succceptibility. Test for bacteria that grow aerobically.**  
*Fourth edition approved standard 1997 NCCLS document*
- 54 NDAW D.A.A.**  
Activité bactéricide in vitro de différentes molécules d antibiotiques sur des souches bactériennes d origines hospitalière.  
*Th. Pharm. Dakar ; 1998 ; N°38.*
- 55 NEUH C., FU K.P.**  
Clavulanic acid a novel inhibitor of  $\beta$ -lactamases.  
*Antimicrob. Agents Chemoth.; 1978; 14; N°5; 650-655.*
- 56 NEUMAN DA.**  
Aquisition récente sur le mode d' action des  $\beta$ -lactamines.  
*Gaz Méd. Fr . 1980; 87; 1-4.*

- 57 Pharmacopée Américaine (USP)**  
Médicaments 2003; p1.
- 58 Pharmacopée Européenne**  
Méthodes de dosage des médicaments  
1999; 56, 577, 1292
- 59 PILLY E.**  
Les Médicaments.  
15<sup>ème</sup> édition, Mont morency, Edition 2M2; 1996, 441-469.
- 60 PILLY E.**  
Les Maladies infectieuses.  
15<sup>ème</sup> édition, Mont morency, Edition 2M2; 1996, 50-315.
- 61 PITTMAN M.**  
Variation and specificity of the bacterial species *Haemophilus influenzae*.  
*Journ. Exp. Med.* 1991; 53: 471 492.
- 62 PORTIER H., BERCHE P., GEHANNO P., DELAMONICA P., PEYRAMOND D., STAHL J.P., DUVAL F.**  
Otites moyennes aiguës de l'enfant :épidémiologie et efficacité, tolérance de la céfatrizine (céfapéros) et du céfadroxil (oracéfal) en pratique de Médecine générale.  
*Med. Mal. Infect.*1996 ;26, *RICAI* : 562-571.
- 63 RAPHENON G.**  
Mécanismes de résistances des bactéries aux antibiotiques.  
*Forum médical* 1996 ; 6-12.
- 64 ROLLINSON GN.**  
Etude comparée de l'activité bactéricide de l' amoxicilline et de l' ampicilline.  
*Méd. Mal. Infect.* 1974 ; 4; 12 ; 651-662.
- 65 ROLINSON GM.**  
 $\beta$ -lactamase induction and resistance to betalactamine.  
*Journ. Anti,icrob. Chemoth.* 1989; 23: 1-5.
- 66 RUBIN LR., MOXON ER.**  
*Haemophilus influenzae* type b; colonisation resulting from survival of a single organism.  
*Journ. Infect. Dis.* 1984; 149: 278-282

- 67 STGME JW., CUTTER D.**  
Influence of pili; fimbriae and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b.  
*Mal. Microbiol.* 1996; 21: 21-31.
- 68 SUTHERLAND R., CROYDON E.A.P., ROLLINSON G.N.**  
Amoxycillin: a new semi-synthetic penicillin.  
*Bact. Med. J.* 1972, 3, No5817, 13-16.
- 69 SY K.T.**  
Souches bactérienne et résistance aux antibiotiques.  
Données actuelles au CHU A. Le DANTEC de Dakar.  
*Th. Pharm ;1996, N°55, p154.*
- 70 THABAUT A.**  
Sensibilité aux antibiotiques des bactéries pathogènes chez chez l'enfant en Afrique.  
*Méd. Mal. Infect.* 1987 ; 17(bis), 192-197.
- 71 THABAUT A., MEYRAN M.**  
La détermination de la concentration minimale bactéricide : influence des différents facteurs techniques.  
*Path. Biol.* 1984 ; 32 : 351-354.
- 72 THABET L., BOUSSETO K., KAABACHI O., SANAGUI H., KECHRID A.**  
Profil bactériologique.  
*Méd. Mal. Infect.* 2002; 32:1-7.
- 73 THOMAS W.J., MC REYNOLDS J.W., MOCK C.R., BALLEY D.W.**  
Ampicillin resistant *Haemophilus influenzae*, *Nesseria meningitidis*.  
*Lancet* 1974; 1 ; 313.
- 74 VAN ALPHEN I., RIEMENS T., POOLMAN J., ZAN EN.**  
Characteristics of major membrane proteines of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications.  
*Journ. Bacteriol.* 1983; 155 : 878-885.
- 75 WADJI S.D.**  
Etude comparative des différentes méthodes de détection sur les souches bactériennes isolées á Dakar.  
*Th. Pharm. UCAD Dakar.* 1993 ; N°84.

**76 ZAOUIN.**

Etude comparée de la sensibilité aux antibiotiques de souches d'*Haemophilus influenzae* et de *Streptocoque pneumoniae* isolées au Maroc et au Sénégal.

*Th. Pharm.* 1998, N°29 ,p101.

# **ANNEXES**

## REACTIFS

Le panel BBL CRYSTAL N/H ID contient 29 substrats enzymatiques et biochimiques. Se référer au tableau 3 pour une liste des ingrédients actifs.

Tableau 3  
Réactifs utilisés dans le système BBL CRYSTAL N/H ID

Pos. sur panel	Substrat	Code	Pos.	Nég.	Réactifs	Quantité approx. (g/L)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	nd	nd	Dérivé coumarinique fluorescent	≤1
2A	4MU-phosphate	FND	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	4MU-phosphate	≤1
1A	L-proline-AMC	FPR	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	L-proline-AMC	≤1
4B	L-sérine-AMC	FSE	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	L-sérine-AMC	≤1
2B	LYS-ALA-AMC	FCA	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	LYS-ALA-AMC	≤1
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	L-tryptophane-AMC	≤1
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	L-phénylalanine-AMC	≤1
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	≤1
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	ALA-ALA-PHE-AMC	≤1
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	Acide L-glutamique-AMC	≤1
2D	L-arginine-AMC	FAR	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	L-arginine-AMC	≤1
1D	Ornithine-AMC	FOR	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	Ornithine-AMC	≤1
4E	Glycine-AMC	FGL	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	Glycine-AMC	≤1
2E	GLY-PRO-AMC	FQP	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	GLY-PRO-AMC	≤1
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	fluorescence bleue -puits FCT	fluorescence bleue -puits FCT	4MU-β-D-galactoside	≤1
4F	Saccharose	SAC	Or/Jaune	Orange/Rouge	Saccharose	≤300
2F	Maltotriose	MTT	Or/Jaune	Orange/Rouge	Maltotriose	≤300
1F	Carubinose	CAR	Or/Jaune	Orange/Rouge	Carubinose	≤300
4G	Pyranose	PYD	Or/Jaune	Orange/Rouge	Pyranose	≤300
2G	Maltobiose	MTB	Or/Jaune	Orange/Rouge	Maltobiose	≤300
1G	Disaccharide	DIS	Or/Jaune	Orange/Rouge	Disaccharide	≤300
4H	Ribérol	RIB	Or/Jaune	Orange/Rouge	Ribérol	≤300
2H	Levulose	LEV	Or/Jaune	Orange/Rouge	Levulose	≤300
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	Jaune	Incolore	p-nitrophényl-phosphorylcholine	≤10
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	Jaune	Incolore	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	≤10
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHD	Jaune	Incolore	p-nitrophényl-phosphate	≤10
1I	ONPG	OPG	Jaune	Incolore	ONPG	≤10
4J	Urée	URE	Bleue-vert/Bleue	Jaune/Vert	Urée	≤50
2J	Résazurine	REZ	Rose	Bleue/Violet	Résazurine	≤1
1J	Ornithine	ORN	Violet	Jaune/Gris	Ornithine	≤200

### Précautions : diagnostic *in vitro*

Après une évaluation par les U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) selon CLIA '88, ce produit a été identifié comme d'haute complexité. Le code identificateur "Analyte" des CDC (Analyte Identifier Code) est 0412 ; le code identificateur du système d'analyse des CDC (Test System Identifier Code) est 07807.

Après usage, tout le matériel contaminé incluant les géloses, les écouvillons, les tubes pour la solution d'inoculum, les papiers filtres utilisés pour les tests d'indole et les panels doivent être autoclavés avant d'être éliminés ou incinérés.

### CONSERVATION ET MANIPULATION/DUREE DE CONSERVATION

**Couvercles** : les couvercles sont emballés individuellement. Ils doivent être conservés dans leur emballage fermé, dans un réfrigérateur à une température de 2 - 8 °C. NE PAS CONGELER. Avant utilisation, vérifier que l'emballage n'est ni percé ni déchiré. Ne pas utiliser si l'emballage semble endommagé. S'ils sont conservés dans leur emballage d'origine selon les consignes de conservation énumérées ci-dessus, les couvercles garderont toutes leurs propriétés réactionnelles jusqu'à la date de péremption.

**Bases** : les bases se présentent sous forme de deux paquets de dix, dans des plaques d'incubation BBL CRYSTAL. Les bases sont empilées la face vers le bas afin de réduire les risques de contamination par l'air. Conserver à l'abri de la poussière, à une température de 2 - 30 °C, jusqu'à leur utilisation. Conserver les bases inutilisées dans la plaque, dans un sac plastique. Les plaques vides doivent être utilisées pour incuber les panels inoculés.

**Solution pour l'inoculum** : la solution BBL CRYSTAL ANR, GP, RGP, N/H ID pour l'inoculum (IF) se présente sous forme de deux paquets de dix tubes. Vérifier visuellement l'absence de fissures, de fuites, etc. Ne pas utiliser en cas de fuite, de tube ou de bouchon endommagé ou de contamination visible à l'œil nu (c.-à-d. opacité, turbidité). Conserver les tubes à une température de 2 - 25 °C. La date de péremption est indiquée sur l'étiquette du tube. Seule la solution BBL CRYSTAL ANR, GP, RGP, N/H pour l'inoculum doit être utilisée avec les panels BBL CRYSTAL N/H ID.

**BD BBLCRYSTAL™**  
*Neisseria/Haemophilus* ID System / N/H 同定検査キット

Reference # / 参照番号 \_\_\_\_\_  
 N° de référence / Referenznr. / N° di riferimento / N° de referência / Referéncia / Referenz  
 Source/Site / 検体採取場所 \_\_\_\_\_  
 Origine/Site / Quelle/Labor. / Provenienza/Sede / Fuente/Lugar / Funtio/Lokal / Källa/Plats / Källa/Sted

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
4	○	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<input type="checkbox"/> - Bacilli
	FCT	FSE	FPH	FTA	FQL	SAC	PYO	RBL	GGL	URE	<input type="checkbox"/> - Bac/W
2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	<input type="checkbox"/> - Cocci
	FHO	FLA	FNS	FAR	FGP	MTT	MTB	LEV	PHO	REZ	<input checked="" type="checkbox"/> - Cocci/Bac/W
1	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	<input type="checkbox"/> - Diplococci
	FPR	FTR	FAA	FOR	FBG	CAR	DIS	PHC	OPG	ORN	

# / N° \_\_\_\_\_  
 番号 \_\_\_\_\_

Organism ID / 細菌同定結果 / ID de l'organisme / ID des Organismus / ID dell'organismo / ID del organismo / ID do Organismo / Organism-ID / Organisma-ID \_\_\_\_\_ **73**

Supplemental Test Information / 追加検査の情報  
 Information d'analyse supplémentaire / Zusätzliche Testinformationen  
 Informazioni di test supplementari / Informazioni del análisis suplementario  
 Informações Suplementares para o Teste / Yhtälgäiset testitiedot  
 Supplementäre testinformation

Reckon, Dickinson and Company  
 Sparks, Maryland 21152 USA  
 38800 Le Port de Clay, France  
 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

Additional Information / 追加の情報  
 Information supplémentaire / Zusätzliche Informationen /  
 Informazioni supplementari / Información adicional /  
 Informações Suplementares / Yhtälgäiset uppläggningar /  
 Ytterligare information

**BD BBLCRYSTAL™**  
*Neisseria/Haemophilus* ID System / N/H 同定検査キット

Reference # / 参照番号 \_\_\_\_\_  
 N° de référence / Referenznr. / N° di riferimento / N° de referência / Referéncia / Referenz  
 Source/Site / 検体採取場所 \_\_\_\_\_  
 Origine/Site / Quelle/Labor. / Provenienza/Sede / Fuente/Lugar / Funtio/Lokal / Källa/Plats / Källa/Sted

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
4	○	-	-	-	-	-	-	-	+	+	<input type="checkbox"/> - Bacilli
	FCT	FSE	FPH	FTA	FQL	SAC	PYO	RBL	GGL	URE	<input checked="" type="checkbox"/> - Bac/W
2	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	<input type="checkbox"/> - Cocci
	FHO	FLA	FNS	FAR	FGP	MTT	MTB	LEV	PHO	REZ	<input type="checkbox"/> - Cocci/Bac/W
1	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	<input type="checkbox"/> - Diplococci
	FPR	FTR	FAA	FOR	FBG	CAR	DIS	PHC	OPG	ORN	

# / N° \_\_\_\_\_  
 番号 \_\_\_\_\_

Organism ID / 細菌同定結果 / ID de l'organisme / ID des Organismus / ID dell'organismo / ID del organismo / ID do Organismo / Organism-ID / Organisma-ID \_\_\_\_\_  
***Haemophilus influenzae***  
**ATCC 49247**

Supplemental Test Information / 追加検査の情報  
 Information d'analyse supplémentaire / Zusätzliche Testinformationen  
 Informazioni di test supplementari / Informazioni del análisis suplementario  
 Informações Suplementares para o Teste / Yhtälgäiset testitiedot  
 Supplementäre testinformation

Reckon, Dickinson and Company  
 Sparks, Maryland 21152 USA  
 38800 Le Port de Clay, France  
 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

Additional Information / 追加の情報  
 Information supplémentaire / Zusätzliche Informationen /  
 Informazioni supplementari / Información adicional /  
 Informações Suplementares / Yhtälgäiset uppläggningar /  
 Ytterligare information

**PLAN DE CONSERVATION  
DES SOUCHES**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27
28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	38	39	40	41	42	43	44	45
46	47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59	60	61	62	63
64	65	66	67	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81

Portoir n°.....

Du .... / .... / .... au .... / .... / ....

Température de cons. : .....

Manipulateur: .....

Appareil (Marque) : .....

Laboratoire : .....

Espèce : .....

(Préciser si c'est un mélange)

Tableau 2  
Principes des tests employés dans le système BBL CRYSTAL N/H ID

Pos. sur panel	Caractéristiques du test	Code	Principe (référence)
4A	Contrôle négatif fluorescent	FCT	Contrôle pour standardiser les résultats des substrats fluorescents.
2A	4MU-phosphate	FHO	L'hydrolyse enzymatique des liens amides ou glycosidiques libère un dérivé coumarinique fluorescent. <sup>1,2,10,11,12</sup>
1A	L-proline-AMC	FPR	
4B	L-sérine-AMC	FSE	
2B	LYS-ALA-AMC	FLA	
1B	L-tryptophane-AMC	FTR	
4C	L-phénylalanine-AMC	FPH	
2C	N-succinyl-ALA-PRO-ALA-AMC	FNS	
1C	ALA-ALA-PHE-AMC	FAA	
4D	Acide L-glutamique-AMC	FTA	
2D	L-arginine-AMC	FAR	
1D	Ornithine-AMC	FOR	
4E	Glycine-AMC	FGL	
2E	GLY-PRO-AMC	FGP	
1E	4MU-β-D-galactoside	FBG	
4F	Saccharose	SAC	La métabolisation des carbohydrates entraîne une baisse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (rouge de phénol). <sup>1,2,11,18</sup>
2F	Maltotriose	MTT	
1F	Carubinose	CAR	
4G	Pyranose	PYO	
2G	Maltobiose	MTB	
1G	Disaccharide	DIS	
4H	Ribérol	RBL	
2H	Levulose	LEV	
1H	p-nitrophényl-phosphorylcholine	PHC	L'hydrolyse enzymatique du substrat glycoside incolore, substitué par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. <sup>1,10,18</sup>
4I	γ-L-glutamyl-p-nitroanilide	GGL	L'hydrolyse enzymatique du substrat amide incolore libère de la p-nitroaniline jaune. <sup>1,10,18</sup>
2I	p-nitrophényl-phosphate	PHO	L'hydrolyse enzymatique du substrat glycoside incolore, substitué par un radical aryl, libère du p-nitrophénol jaune. <sup>1,10,18</sup>
1I	o-nitrophényl-β-D-galactoside (ONPG)	OPG	
4J	Urée	URE	L'ammoniac qui résulte de l'hydrolyse de l'urée fait virer l'indicateur coloré de pH (bleu de bromothymol). <sup>2,7,12</sup>
2J	Résazurine	REZ	La réduction à résorufine de la résazurine entraîne un changement de couleur. <sup>8</sup>
1J	Ornithine	ORN	La métabolisation de l'ornithine entraîne une hausse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (pourpre de bromocrésol). <sup>2</sup>

