

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMORCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahlab de Blida

Faculté des sciences Agro-vétérinaires et biologiques

Département de Biologie



**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN
BIOLOGIE**

Spécialité : MICROBIOLOGIE / BACTERIOLOGIE

Présenté par : DEMIAI Afafe

Thème :

DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DES OTITES

Jury composé de :

Noms et prénoms	Grade	Lieu d'exercice	Qualité
Mme KHETTAR S.	MAB	USDB	Présidente
Dr. HAMAIDI M. S.	MCA	USDB	Promoteur
Dr. BENAMARA-BOUHRAOUA M.	Assistante	CHU de Blida	Co-promotrice
Mme CHERRALLAH A.	MAA	USDB	Examinatrice
Mme MOHAMED MAHMOUD F.	MAA	USDB	Examinatrice

Promotion : 2012 – 2013

Remerciements

J'exprime mes louanges à Dieu le tout puissant de m'avoir permis d'accomplir ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements aux personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à remercier Professeur BELLOUNI R. de m'avoir accordé la chance de faire mon stage au niveau du laboratoire centrale du CHU Blida à l'unité de Microbiologie.

Mes sincères remerciements à mon promoteur Dr. HAMAIDI M.S. pour son aide et pour le temps qu'il a pris pour me guider avec ses conseils judicieux et sa rigueur scientifique.

Je tiens à remercier infiniment ma Co-promotrice Dr. BENAMARA-BOUHRAOUA M. qui m'a beaucoup aidée, pour sa patience, sa disponibilité, tout mes respects et sincères remerciements de m'avoir guidée et orientée tout au long de ma période de stage.

Je tiens à remercier les membres du jury :

Mme KHETTAR S. de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mme CHERRALLAH A. et Mme MOHAMED MAHMOUD F. d'avoir bien voulu faire partie du jury.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Dr. AZROU et Dr. BEROUAKEN.

Je tiens aussi à remercier les biologistes de l'unité de Microbiologie : AMEL, SAMIRA, NASSIMA, FATIHA, LILA et FATIMA ; ainsi que les médecins résidents et toute l'équipe du laboratoire central du CHU de Blida pour leur gentillesse et leur aide considérable.

Mes sincères remerciements à tous les enseignants qui m'ont transmis leur savoir ainsi que toute personne ayant contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui me sont chers, en particulier :

Mon très cher père, qui m'a toujours soutenu et qui m'a aidé par ses conseils judicieux durant toutes mes années d'études.

Ma très chère mère, qui ne cesse de m'encourager et m'aider en toutes circonstances.

A mes chères grands-mères que Dieu leurs accorde une longue vie et les protège.

A mon frère Ahmed et ma sœur Zineb, en leur souhaitant plein de succès et de réussite dans leur vie.

A toutes mes tantes et tous mes oncles.

A mes cousins et cousines : Asma, Fella, Madina, Zaki, Younes, Mohamed et Amina.

A toutes mes amies que j'apprécie : Chanez, Meriem, Linda, Hayet, Khadidja, Nahla, Nihal, Amina, Yasmine, Meriem, Sarah, Nabila, Melissa, Hiba, Ihsen, Samira, Djahida et à la promotion Microbiologie 2011.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre I : Recherche bibliographique	
I.1. Oreille	2
I.1.1. Rappel anatomique de l'oreille	2
I.1.2. Flore commensale de l'oreille	3
I.2. Otites	3
I.2.1. Définition.....	3
I.2.2. Classification.....	4
I.2.3. Pus et suppuration	5
I.2.4. Complications	5
I.3. Etiologie bactérienne des otites	6
I.3.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	6
I.3.2. Les streptocoques.....	7
I.3.3. <i>Moraxella catarrhalis</i>	11
I.3.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
I.3.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
I.3.6. Les entérobactéries	14
I.4. Antibiorésistance des bactéries responsables d'otites	17
Chapitre II : Matériel et méthodes	
II.1. Matériel	19
II.1.1. Matériel non biologique.....	19
II.1.2. Matériel biologique.....	19
II.2. Méthodes	20
II.2.1. Examen macroscopique	20

II.2.2. Examen microscopique	20
II.2.3. Mise en culture	22
II.2.4. Identification des colonies suspectes	22
II.2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries incriminées	29
II.2.6. Conservation des souches	36
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1. Résultats	38
III.1.1. Résultats de l'étude rétrospective	38
III.1.2. Résultats de l'étude prospective	41
III.1.2.1. Répartition des prélèvements selon les services pourvoyeurs.....	41
III.1.2.2. Répartition des pus auriculaires selon le mode de prélèvement.....	41
III.1.2.3. Taux de positivité des cultures.....	42
III.1.2.4. Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram.....	42
III.1.2.5. Répartition des bactéries incriminées selon le genre bactérien	43
III.1.2.6. Répartition selon les espèces bactériennes isolées.....	43
III.1.2.7. Antibiorésistances des principales bactéries mises en causes	44
III.2. Discussion	47
Conclusion	50
Références bibliographiques	
Annexes	

LISTE DES FIGURES

Figure N°01 : Anatomie de l'oreille.....	3
Figure N°02 : Les étapes essentielles de l'analyse bactériologique.....	20
Figure N°03 : Mise en évidence de la fermentation des sucres.....	28
Figure N°04 : Kit d'agglutination des streptocoques.....	27
Figure N°05 : Kit d'agglutination pour l'identification antigénique des staphylocoques.....	28
Figure N°06 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2010.....	39
Figure N°07 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2011.....	40
Figure N°08 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2012.....	41
Figure N°09 : Taux de positivité des prélèvements de pus auriculaires reçus.....	42
Figure N°10 : Taux de cultures monomicrobiennes et polymicrobiennes.....	42
Figure N°11 : Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram.....	43
Figure N°12 : Répartition des bactéries incriminées selon le genre bactérien.....	43
Figure N°13 : Répartition des espèces bactérienne isolées.....	44
Figure N°14 : Gélose au sang frais (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°15 : Gélose au sang cuit (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°16 : Milieu Chapman (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°17 : Milieu Hecktoen (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°18 : Milieu Mueller Hinton (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°19 : Microscope optique (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°20 : Etuve (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°21 : Bec bunsen (Originale).....	(Annexe N°01)

Figure N°22 : Densitomètre (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°23 : Jarre (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°24 : Distributeur d'antibiotiques (Originale).....	(Annexe N°01).
Figure N°25 : Bouillon BHIB (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°26 : Eau physiologique stérile à 0,9% (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°27 : Disques d'antibiotique (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°28 : Bandelettes E-test (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°29 : Lamelles (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°30 : Ecouvillon (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°31 : Disques d'oxydase (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°32 : Bleu de méthylène (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°33 : Violet de gentiane (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°34 : Lugol (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°35 : Alcool (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°36 : Fuschine (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°37 : Milieu citrate de simmons (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°38 : Milieu de conservation (Originale).....	(Annexe N°01)
Figure N°39 : Etapes de la coloration de Gram (Originale).....	(Annexe N°02)
Figure N°40 : Observation microscopique après coloration de Gram montrant des diplocoques à Gram positif.....	(Annexe N°05)
Figure N°41 : Observation microscopique de bacilles à Gram négatif.....	(Annexe N°05)
Figure N°42 : Test de la catalase positif.....	(Annexe N°05)
Figure N°43 : Test de l'oxydase.....	(Annexe N°05)
Figure N°44 : Agglutination aux particules de latex pour l'identification des streptocoques.....	(Annexe N°05)
Figure N°45 : Test d'agglutination des staphylocoques négatif.....	(Annexe N°05)

- Figure N°46** : Test de satellitisme.....(Annexe N°05)
- Figure N°47** : Détermination de la CMI par technique de dilution en gélose...(Annexe N°05)
- Figure N°48** : Détermination de la CMI par la technique E-test.....(Annexe N°05)
- Figure N°49** : Test de synergie négatif.....(Annexe N°05)
- Figure N°50** : Technique du double disque.....(Annexe N°05)
- Figure N°51** : Test de trèfle négatif.....(Annexe N°05)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Bactéries responsables d'otites.....	6
Tableau II: Principaux caractères biochimiques différentiels des genres et espèces bactériennes appartenant à la famille des entérobactéries.....	16
Tableau III: Différentes souches de références utilisées.....	19
Tableau IV : Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes.....	30
Tableau V: Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes.....	31
Tableau VI: Recherche de la résistance à l'oxacilline et interprétation des tests (méthode de diffusion des disques).....	34
Tableau VII: Résultats de l'étude rétrospective.....	38
Tableau VIII : Répartition des consultants selon les services pourvoyeurs.....	41
Tableau IX : Fréquence de résistance de <i>Pseudomonas</i> vis-à-vis des antibiotiques testés.....	44
Tableau X : Profil de résistance des 3 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistantes à l'imipénème.....	45
Tableau XI : Fréquence de résistance de <i>S. aureus</i> vis-à-vis des antibiotiques testés.....	45
Tableau XII : Etude de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques.....	46
Tableau XIII : Antibiorésistance des souches d' <i>Haemophilus influenzae</i> isolées.....	46
Tableau XIV : Résistance des souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	46
Tableau XV : Matériel non biologique.....(Annexe N°01)	
Tableau XVI: Résultats de l'identification et l'étude de la sensibilité des bactéries incriminées.....(Annexe N°05)	

Tableau XVII : Technique d'antibiogramme (diffusion de disques antibiotiques).....	(Annexe N°06)
Tableau XVIII : Tableau de lecture de la galerie API 20E.....	(Annexe N°07)
Tableau XIX : Tableau de lecture de la galerie API 20 NE.....	(Annexe N°07)
Tableau XX : Préparation des dilutions d'antibiotique.....	(Annexe N°08)
Tableau XXI : Liste des abréviations des antibiotiques.....	(Annexe N°08)
Tableau XXII : Fréquences des bactéries isolées en 2010.....	(Annexe N°09)
Tableau XXIII : Fréquences des bactéries isolées en 2011.....	(Annexe N°09)
Tableau XXIV : Fréquence des bactéries isolées en 2012.....	(Annexe N°09)
Tableau XXV : Fréquences des bactéries isolées durant 5 mois (Février – Juin 2013).....	(Annexe N°09)
Tableau XXVI : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries.....	(Annexe N°10)
Tableau XXVII : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(Annexe N°10)
Tableau XXVIII : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Acinetobacter spp</i>	(Annexe N°10)
Tableau XXIX : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Staphylococcus spp</i>	(Annexe N°10)
Tableau XXX : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Streptococcus pneumoniae</i>	(Annexe N°10)

ABBREVIATIONS

ADH : Arginine-dihydrolase

ATCC: American Type Culture Collection

BHIB: *Brain-Heart Infusion Broth*

C3G: Céphalosporine de 3ème generation

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : concentration minimale inhibitrice

LDC : Lysine-décarboxylase

MF: McFarland

NAD: Nicotinamide adénine dinucléotides

ODC : Ornithine-décarboxylase

ONPG : Ortho-nitrophényl- β -galactoside

ORL : Oto-rhino-laryngologie

PDA : Phénylalanine désaminase

PLP : Protéines liant la pénicilline

TDA : Tryptophane désaminase

TSI: Triple Sugar Iron

VP : Voges Proskauer

GLOSSAIRE

Méat acoustique : est un canal qui s'étend de la conque à la membrane du tympan (**Leblanc, 2004**).

Otorrhée : peut être défini comme l'issue ou l'écoulement de liquide par l'oreille. Si l'otorrhée est purulente ceci implique l'écoulement de pus, de mucus ou de sérosité (**Ayache et Bonfils, 2001**).

Paracentèse : c'est une perforation chirurgicale du tympan pour laisser le pus s'écouler à l'extérieur (**Hervé et Loriol, 2008**).

Vestibulo-cochléaire : Vestibule : c'est une cavité osseuse qui contient deux poches membranaires et qui communique avec la caisse du tympan (**Nguyen et Bourouina, 2008**) ;
cochlée : canal osseux en forme de spirale formant une partie de l'oreille interne (**Suddarth, 2006**)

RÉSUMÉ

L'otite est la plus fréquente des infections ORL. C'est une pathologie qui peut atteindre l'oreille externe, moyenne et interne, et provoque la formation de suppurations.

L'étude a porté sur 105 prélèvements auriculaires, qui doivent passer par plusieurs étapes d'identification pour la recherche de l'agent infectieux: l'examen macroscopique et microscopique du prélèvement, mise en culture, les différentes colorations, les tests biochimiques et antigéniques, ainsi chaque souche incriminée doit bénéficier d'une étude de la sensibilité aux antibiotiques.

Nos résultats montrent l'isolement de deux espèces prédominantes *Pseudomonas aeruginosa* à une fréquence de 22,89% et *Staphylococcus aureus* à un taux de 20,48%. D'autres espèces ont été isolées comme les entérobactéries, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*.

Les résultats de l'antibiogramme ont indiqué que la majorité des souches isolées sont sensibles à la plupart des antibiotiques testés.

Mots clés :

Otite, suppurations auriculaires, diagnostic bactériologique, bactéries, antibiogramme.

SUMMARY

Otitis is the most common ear-nose and throat (ENT) infections. This pathology can reach the outer, middle and inner ear, and causes the constitution of suppurations.

The study looked at 105 samples ear, which must go through several stages of research for identification of the infectious agent: macroscopic and microscopic examination of the collection, cultivation, different colorations, biochemical and antigenic tests, and each implicated strain should have a study of sensitivity to antibiotics.

Our results show the isolation of two predominant species: *Pseudomonas aeruginosa* at a frequency of 22,89 %, and *Staphylococcus aureus* at a rate of 20,48 %.

Other species were isolated as Enterobacteriaceae, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae*.

The results of susceptibility testing indicated that the majority of isolated strains were susceptible to most antibiotics tested.

Keywords:

Otitis, ear suppuration, bacteriological diagnosis, bacteria, antibiogram.

المخلص

التهاب الاذن هو أكثر التهابات الاذن - الانف و الحنجرة شيوعا. هذا المرض يمكن ان يؤثر على الاذن الخارجية، الوسطى و الداخلية، و يتسبب في تشكيل تقيجات.

ركزت الدراسة على 105 عينات الاذن والتي يجب أن تمر عبر عدة مراحل من البحوث لتحديد وكيل المعدية: الفحص بالعين المجردة و الفحص المجهرى للعينة، الزراعة في وسط ملائم، القيام بجميع الصبغات، اختبارات الكيمياء الحيوية و المستضد، و اخيرا دراسة الحساسية اتجاه المضادات الحيوية لمختلف البكتيريا المعزولة.

نتائجنا تظهر اننا عزلنا اثنين من الانواع السائدة : الزائفة الزنجارية بنسبة مئوية تقدر ب 22,89 % و المكورات العنقودية الذهبية بنسبة 20,48 %.

كما اننا تمكنا من عزل انواع اخرى من البكتيريا كالبكتيريا المعوية، المستديمة النزلية و العقديّة الرئوية.

اشارت نتائج اختبار الحساسية ان الغالبية العظمى من السلالات المعزولة كانت حساسة لمعظم اختبارات المضادات الحيوية.

كلمات البحث :

التهاب الاذن، تقيجات الاذن، التشخيص البكتيريولوجي، البكتيريا، اختبار الحساسية.

Introduction

La pathologie infectieuse oto-rhino-laryngologique (ORL) est l'une des causes les plus fréquentes de consultation en médecine générale. La sphère oto-rhino-laryngologique (ORL) est particulièrement exposée tant par la sphère aérienne que digestive (**Portman et al., 1997**).

La pathologie infectieuse et inflammatoire de la sphère ORL est une pathologie fréquente qui peut affecter différentes régions anatomiques (**Souillard-Scemama et Dubrulle, 2012**).

Selon **Aveline et al. (2001)**, les infections ORL sont très fréquentes, et sont le plus souvent bénignes. Leur guérison spontanée peut atteindre 80% des cas.

L'otite est une inflammation de l'oreille externe ou moyenne ; dont les plus fréquentes notamment chez les jeunes enfants touchent l'oreille moyenne (**Lamontagne et al., 2010**).

Elles sont généralement perçues comme étant d'origine bactérienne ou virale (**Barry, 2005**). Mais deux tiers des otites moyennes aiguës sont d'origine bactérienne (**Dubreuil, 2001**).

L'étude du liquide d'oreille permet de mettre en évidence les bactéries responsables de l'infection (**Lescanne et al., 2006**).

C'est dans ce contexte qu'un diagnostic bactériologique des suppurations produites lors des pathologies auriculaires est nécessaire, pour l'identification de l'agent infectieux.

Notre travail se répartit en deux volets :

- Une étude rétrospective étalée sur une période de trois années allant de Janvier 2010 à Décembre 2012, et portant sur les prélèvements auriculaires reçus.
- Une étude prospective effectuée sur les prélèvements auriculaires reçus pendant la période allant du mois de Février au mois de Juin 2013.

L'objectif de ce travail consiste à :

- Etablir une fiche technique pratique pour le diagnostic bactériologique des suppurations auriculaires.
- Rechercher les agents bactériens incriminés.
- Etudier la sensibilité des bactéries incriminées aux différents antibiotiques.

CHAPITRE I

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Oreille :

I.1.1. Rappel anatomique de l'oreille :

L'oreille ou organe vestibulo-cochléaire comprend trois parties : externe, moyenne et interne, et possède deux fonctions : l'équilibration et l'audition (**Moore et Dalley, 2001**).

L'oreille externe et l'oreille moyenne servent uniquement à l'audition et leurs configurations sont relativement simples. L'oreille interne sert à l'audition et à l'équilibre, sa structure est extrêmement complexe (**Marieb et Hoehn, 2010**). (Figure N°1)

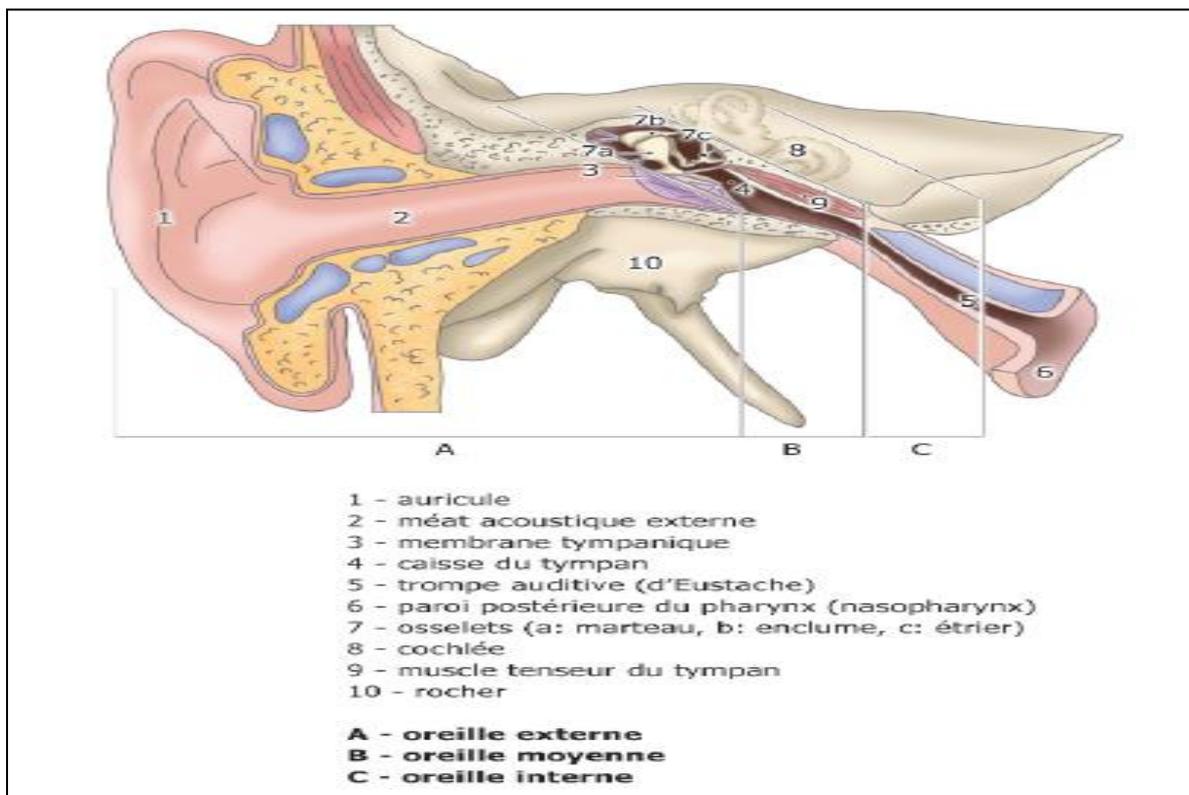


Figure N°1 : Anatomie de l'oreille (Hallouët, 2010).

Les parties externe et moyenne sont principalement concernées par la transmission du son vers l'oreille interne ; celle-ci renferme les organes de l'équilibration (condition qui permet le maintien du corps en équilibre) et de l'audition (exercice du sens de l'ouïe).

La membrane du tympan sépare l'oreille externe de la caisse du tympan ou cavité tympanique, une partie de l'oreille moyenne (**Moore et Dalley, 2001**).

Le tympan est une membrane mince et translucide de tissu conjonctif dont la face externe est recouverte de peau et la face interne, d'une muqueuse (**Marieb et Hoehn, 2010**).

La trompe auditive (trompe d'Eustache) fait communiquer l'oreille moyenne avec le nasopharynx (**Moore et Dalley, 2001**).

I.1.2. Flore commensale de l'oreille :

L'étude de l'écologie microbienne cutanée permet de décrire un certain nombre de micro-organismes constituant la flore commensale du conduit auditif externe, parmi eux se trouvent des bactéries (**Malard et al., 2005**).

Selon **Malard et al. (2005)**, les germes les plus fréquemment retrouvés peuvent être classés en quatre groupes :

- Les staphylocoques à coagulase négative sont les plus nombreux, les deux principaux sont *Staphylococcus auricularis* et *Staphylococcus capitis*.
- Les diphtéroïdes aérobies ou corynéformes sont fréquemment retrouvés dans le conduit auditif externe.
- Les diphtéroïdes anaérobies sont retrouvés de façon moins fréquente, il s'agit surtout du groupe des *Propionibacterium*.
- D'autres bactéries comme *Escherichia coli*, *Proteus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont retrouvés de façon sporadique dans le conduit auditif externe sain.

Les bactéries de la flore du rhinopharynx *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* et *Streptococcus pneumoniae* colonisent l'épithélium l'oreille moyenne par la trompe d'Eustache, généralement à la suite d'une infection virale (**Dubreuil, 2001**).

I.2. Otites :

I.2.1. Définition :

Une otite est l'inflammation du tympan, de l'oreille externe et du conduit auditif (**Stora, 2010**).

I.2.2. Classification :

Selon **Ricard (2010)**, on distingue trois types d'otites :

- Otite externe.
- Otite moyenne aiguë.
- Otite moyenne chronique.

I.2.2.1 Otite externe:

Une otite externe est une infection bactérienne de la peau du méat acoustique externe (**Moore et Dalley, 2001**). Ce type d'otite est provoqué par un processus inflammatoire et infectieux de l'oreille externe par infection de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* (**Ricard, 2010**).

La maladie se développe si une contamination bactérienne du méat acoustique coïncide avec une situation de macération de la peau interne. La peau du méat, dépourvue de moyens de protection, macère en raison de l'humidité et de la chaleur et sert de bouillon de culture aux bactéries (**Ricard, 2010**).

I.2.2.2. Otite moyenne aiguë :

Une otite moyenne aiguë consiste en une accumulation de liquide dans l'oreille moyenne accompagnée d'une inflammation aiguë (**Runge et Greganti, 2011**).

Il s'agit d'une infection, en règle purulente, intéressant la caisse du tympan. C'est l'une des infections bactériennes les plus fréquentes de l'enfant (**Molinier et al., 2008**).

L'infection est le plus souvent due à *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* et *Moraxella catarrhalis* (**Ricard, 2010**).

Une infection de l'oreille moyenne est souvent secondaire à une infection des voies respiratoires supérieures (**Moore et Dalley, 2001**).

Selon **Molinier et al. (2008)**, cette otite peut être :

- Congestive : il existe une inflammation du tympan mais sans collection en arrière du tympan.
- Suppurée : il existe une collection purulente rétrotypanique, sous pression (aspect de tympan bombant) ou non, avec des tympans inflammatoires rouges, voire jaunes.

I.2.2.3. Otite moyenne chronique :

C'est une inflammation chronique avec affectation superficielle des parois de la fente de l'oreille moyenne. L'otorrhée est purulente, parfois hémorragique et fétide selon la quantité et le type de micro-organismes (**Ricard, 2010**).

I.2.3. Pus et suppuration :

I.2.3.1. Définitions :

D'après **Quevauvilliers et al. (2009)**, une suppuration est la formation de pus, et les prélèvements appelés pus englobent toutes les suppurations qu'elles soient superficielles ou profondes (**Denis et al., 2007**).

Selon **Marieb et Hoehn (2010)**, c'est une substance fluide composée de liquide interstitiel, de bactéries, de cellules mortes ou mourantes, de globules blancs et de macrophagocytes. Il apparaît dans une région infectée ou enflammée.

I.2.3.2. L'inflammation :

Le pus résulte de la migration rapide de polynucléaires neutrophiles vers un site contenant des bactéries. Ces neutrophiles sont attirés par des substances chimiotactiques produites par les bactéries elles-mêmes ainsi que par les tissus et les composants du sérum. Lorsque les polynucléaires neutrophiles meurent, ils libèrent des hydrolases puissantes contenues dans leurs granules lysosomales. Ces enzymes vont causer des dégâts dans les tissus environnants, étendant la lésion à des territoires adjacents (**Schaechter et al, 1999**).

I.2.4. Complications :

La plupart des complications des otites moyennes sont d'origine infectieuse, d'où **François (2005)**, y répertorie certaines de ces complications :

- Une otite moyenne aiguë peut s'accompagner d'une bactériémie.
- Une mastoïdite.
- Les paralysies faciales d'origine otitique.
- Les méningites purulentes otogènes.

Cependant, les complications des otites moyennes sont plus fréquentes en cas d'immunodépression (**François, 2005**).

L'otite maligne externe est une infection grave du conduit auditif externe, causée de manière quasi exclusive par une bactérie : *Pseudomonas aeruginosa* (Bokowy et al., 1995). Elle survient chez les patients diabétiques et immunodéprimés, et sa diffusion à la base du crâne, survenant dans 20 % des cas, en fait sa gravité (Souillard-Scemama et Dubrulle, 2012).

I.3. Etiologie bactérienne des otites :

En fonction de l'âge des patients, de la saison, des conditions de vie ou encore des pays, l'épidémiologie bactérienne est différente (Lescanne et al., 2006).

Les principales bactéries responsables d'otites sont mentionnées dans le tableau ci-dessous:

Tableau I : Bactéries responsables d'otites (REMIC, 2010).

Otite moyenne aiguë		Otite chronique	Otite externe
Enfant de plus de 3 mois et adultes	Nourrissons de moins de 3 mois	Quelque soit l'âge	Quelque soit l'âge
- <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Branhamella catarrhalis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	Idem plus : - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Entérobactéries	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Entérobactéries - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i> - Anaérobies	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pyogenes</i> - Entérobactéries

I.3.1. *Haemophilus influenzae* :

I.3.1.1. Taxonomie et habitat :

Haemophilus influenzae appartient à la famille des *Pasteurellaceae*. C'est l'exemple type de bactérie strictement inféodée à l'homme (Dabernat, 2004).

Les espèces du genre *Haemophilus* sont des parasites obligatoires qui font partie de la flore des voies aériennes supérieures de l'homme. La présence de souches non capsulées de *Haemophilus influenzae* y est habituellement. Seulement une faible proportion des individus sont porteurs sains, au niveau du nasopharynx, de souches capsulées potentiellement pathogènes de *Haemophilus influenzae* (Fauchère et Avril, 2002).

I.3.1.2. Caractères bactériologiques :

a) Caractères morphologiques :

Les bactéries du genre *Haemophilus* sont de petits bacilles ou coccobacilles à Gram négatif avec un polymorphisme important. Elles sont immobiles, non sporulées, parfois capsulées (Dabernat, 2004).

b) Caractères cultureux :

La bactérie ne pousse pas sur gélose ordinaire. Les deux facteurs de croissance (le facteur X ou hémine et le facteur V ou NAD), sont indispensables pour la croissance de *Haemophilus influenzae*. Ils sont contenus dans la gélose au sang cuit (Fauchère et Avril, 2002).

D'après Singleton (2005), le facteur X et le facteur V sont présents dans les globules rouges lysés.

c) Caractères biochimiques :

Habituellement, elle fermente le glucose mais pas le lactose, et la température optimale est 35-37°C (Singleton, 2005).

d) Facteurs de virulence :

Les souches de *Haemophilus influenzae* provenant de produits pathologiques possèdent habituellement une capsule. Les polysaccharides capsulaires permettent de distinguer six sérotypes (a à f). Le polyribosyl-ribitol phosphate (PRP) est le principal constituant de la capsule de *Haemophilus influenzae* de sérotype b, le plus virulent. La capsule est un facteur de virulence ; elle protège la bactérie de la phagocytose (Fauchère et Avril, 2002).

I.3.2. Les Streptocoques :

I.3.2.1. Classification :

Le genre *Streptococcus* appartient à la famille des *Streptococcaceae*, qui comporte plusieurs espèces (Kayser et al., 2008).

Pour classer les streptocoques, un premier élément d'orientation est le caractère de l'hémolyse entourant les colonies sur une gélose au sang. On distingue les streptocoques β -hémolytiques produisant une hémolyse complète, les streptocoques α -hémolytiques

produisant une hémolyse incomplète et les streptocoques non-hémolytiques (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Une autre classification des streptocoques est basée sur des critères immunologiques (classification de Lancefield). La plupart des streptocoques possèdent dans leur paroi un polysaccharide C dont la composition et les propriétés antigéniques variables permettent de définir des groupes sérologiques. Cette classification répertorie 18 groupes sérologiques (désignés de A à H et de K à T). Les streptocoques dépourvus d'antigène polysaccharidique sont ingroupables par la méthode de Lancefield. Ils sont identifiés par leurs caractères cultureux et biochimiques. *Streptococcus pyogenes* est un streptocoque du groupe A (**Fauchère et Avril, 2002**).

Streptococcus pneumoniae tient une place à part dans le genre *Streptococcus* et conserve la dénomination commune de pneumocoque (**Nauciel et Vildé, 2005**).

I.3.2.2. *Streptococcus pneumoniae* :

a) Habitat :

Streptococcus pneumoniae est strictement humaine (**Grosjean et al., 2009**).

C'est une bactérie souvent présente à l'état commensal dans les voies aériennes supérieures (rhinopharynx) (**Nauciel et Vildé, 2005**).

b) Caractères bactériologiques :

➤ Caractères morphologiques :

Les pneumocoques sont des cocci à Gram positif, de forme ovale ou en flamme de bougie, qui se présentent en paires ou en chaînettes courtes. Les cellules sont souvent entourées d'une capsule épaisse (**Kayser et al., 2008**).

➤ Caractères cultureux :

C'est une bactérie très fragile, sensible au froid et à la dessiccation et qui s'autolyse rapidement en culture (**Fauchère et Avril, 2002**).

Aéro-anaérobie, sa culture en milieux riches (gélose au sang) doit être faite à 37°C (**Fauchère et Avril, 2002**).

Les colonies ont un aspect souvent caractéristique et sont α -hémolytiques (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Les colonies de *Streptococcus pneumoniae* sont petites et verdâtres, et se distinguent des autres *Streptococcus* par sa sensibilité à l'optochine et par la lyse que produisent les sels biliaires sur une culture en bouillon (Fauchère et Avril, 2002).

➤ **Caractères biochimiques :**

Denis et al. (2007), citent différents tests spécifiques permettant d'identifier de façon rapide et présomptive les pneumocoques :

- Sensibilité à l'optochine : seuls les pneumocoques sont sensibles à l'optochine, tout en sachant que 5% des souches peuvent être résistantes.
- Sensibilité dans la bile : parmi les streptocoques, seuls les pneumocoques sont solubles dans la bile.
- Agglutination : l'agglutination avec des particules de latex sensibilisées avec des pools d'anticorps anticapsulaires peut permettre de confirmer l'identification du pneumocoque.

➤ **Facteurs de virulence:**

Fauchère et Avril (2002) ont répertorié les différents facteurs de virulence :

- La capsule est de nature polysaccharidique, de composition variable en fonction du sérotype, a un rôle très important dans la virulence. Elle empêche la phagocytose de la bactérie. Cette capsule est antigénique ; à l'aide d'antisérums, on peut individualiser 90 sérotypes.
- La pneumolysine est une cytotoxine libérée au cours de lyse bactérienne. Elle agit sur les membranes cellulaires, et induit la production de cytokines et exacerbe la réponse inflammatoire.
- Des enzymes autolytiques dégradent le peptidoglycane dont les fragments et les acides teichoïques libérés induisent une réaction inflammatoire intense et la sécrétion abondante de cytokines.

I.3.2.3. *Streptococcus pyogenes*

a) Habitat :

C'est une bactérie strictement humaine (Grosjean et al., 2009).

Son habitat habituel est le pharynx, mais on peut la trouver également sur la peau. Certains sujets sont des porteurs sains (**Nauciel et Vildé, 2005**).

b) Caractères bactériologiques :

➤ **Caractères morphologiques :**

Streptococcus pyogenes se présente sous l'aspect de cocci à Gram positif disposés en chaînettes, de diamètre inférieur à 2mm, immobiles et asporulés (**Goubau et Van Gompel, 2000**).

➤ **Caractères cultureux :**

Dépourvus de catalase et aéro-anaérobies, les streptocoques du groupe A donne sur gélose au sang des colonies petites (0,5 mm), transparentes et bêta-hémolytiques. Ce caractère est dû à la production de streptolysines (**Fauchère et Avril, 2002**).

➤ **Caractères biochimiques :**

Selon **Grosjean et al. (2009)**, *Streptococcus pyogenes* est :

- Oxydase négatif
- Catalase négatif

➤ **Caractères de virulence :**

D'après **Fauchère et Avril (2002)**, certains facteurs de virulence sont dus à :

1. Antigènes de paroi :

- Le polyoside C : il est le même pour tous les streptocoques A et est utilisé pour le groupage dans le système de Lancefield, et ne suscite pas la formation d'anticorps protecteurs.
- La protéine M : au sein du groupe A, on peut distinguer environ 60 types de streptocoques qui ont une protéine M différente. La protéine M a un rôle dans la virulence, et suscite la formation d'anticorps protecteurs.
- La protéine T : elle est utilisable pour le typage épidémiologique mais ces typages ne sont possibles que dans les laboratoires très spécialisés.

2. Toxines :

Selon **Kayser et al. (2008)**, le streptocoque A produit de très nombreuses substances toxiques dont : la streptolysine O et la streptolysine S, qui détruisent la membrane des érythrocytes et des autres cellules.

3. Enzymes :

Streptococcus pyogenes excrète diverses enzymes qui pourraient favoriser sa diffusion : hyaluronidase, plusieurs DNAses, protéases, streptokinases (**Nauciel et Vildé, 2005**).

I.3.3. *Moraxella catarrhalis* :

I.3.3.1. Classification :

Appartenant depuis 1991 à la famille des *Moraxellaceae*, le genre *Moraxella* est subdivisé en deux sous-genres : *Moraxella* et *Branhamella*. Le sous-genre *Moraxella* regroupe les espèces bacillaires tandis que le sous-genre *Branhamella* regroupe quatre espèces coccoïdes (*Branhamella catarrhalis*, *B. caviae*, *B. cuniculi*, *B. bovis*) (**De La Blanchardière et al., 2009**).

I.3.3.2. Habitat :

L'habitat de *Moraxella catarrhalis* est exclusivement humain (**De La Blanchardière et al., 2009**).

Elle est souvent présente dans les fosses nasales de l'homme sain et qui sont considérées comme l'habitat naturel de cette espèce (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.3.3.3. Caractères bactériologiques :

Selon **De La Blanchardière et al. (2009)**, ce sont des cocci à Gram négatif, immobiles, en diplocoques ou tétracoques.

Cette bactérie se développe sur les milieux de culture ordinaires en aérobiose stricte sans CO₂. Cependant, sa culture sur gélose chocolat en CO₂ permet l'identification en 24 heures (**De La Blanchardière et al., 2009**). Elle est oxydase positive (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.3.3.4. Pouvoir pathogène :

Moraxella catarrhalis est responsable de 10 à 15% des cas de sinusites ou de 5 à 10% des otites moyennes chez l'enfant. Cette bactérie peut aussi être responsable d'arthrite, de méningites ou d'endocardites (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.3.4. *Staphylococcus aureus*

I.3.4.1. Historique :

Les Staphylocoques ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de « Staphylocoque » pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (**Avril et al, 1992**).

I.3.4.2. Classification :

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Micrococcaceae* (**Fauchère et Avril, 2002**).

Fauchère et Avril (2002), classifient les staphylocoques en :

- L'espèce *Staphylococcus aureus*, qui produit une coagulase.
- Les espèces à coagulase négative. *Staphylococcus epidermidis* est la plus souvent rencontrée.

I.3.4.3. Habitat :

Staphylococcus aureus est un germe ubiquitaire, retrouvé dans le sol, l'air et l'eau. C'est un commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. On le trouve à l'état normal dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau du périnée ou des aisselles (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.3.4.4. Caractères bactériologiques :

a) Caractères morphologiques :

Selon **Vandenesch et al. (2007)**, *Staphylococcus aureus* sont identifiés comme étant des cocci à Gram positif, immobiles, disposés en amas, à la façon d'une grappe de raisin.

b) Caractères culturels :

La bactérie se cultive facilement sur les milieux usuels et aussi sur des milieux riches en NaCl. Elle doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Les staphylocoques sont des aéro-anaérobies. Après une culture de 24 heures sur gélose nutritive, *Staphylococcus aureus* donne des colonies produisant en général un pigment doré.

Il pousse et fermente le mannitol sur milieu de Chapman, faisant virer le rouge de phénol au jaune. Ce milieu contient une concentration de 7,5% de NaCl qui inhibe la plupart des autres germes (**Fauchère et Avril, 2002**).

c) Caractères biochimiques :

D'après **Kayser et al. (2008)**, les staphylocoques produisent une catalase.

Ce qui caractérise le mieux l'espèce *Staphylococcus aureus* c'est la production d'une coagulase.

Et selon **Nauciel et Vildé (2005)**, *Staphylococcus aureus* peut produire de nombreuses toxines en plus de la coagulase.

d) Facteurs de virulence :

Des constituants de la paroi et des substances enzymatiques ou toxines produites par *Staphylococcus aureus* sont des facteurs de virulence (**Fauchère et Avril, 2002**).

- Constituants de la paroi :

Le peptidoglycane et les acides teichoïques induisent la production de cytokines impliquées dans le choc infectieux (**Fauchère et Avril, 2002**).

La paroi de *Staphylococcus aureus* contient un constituant, la protéine A, qui a la propriété de fixer les immunoglobulines G par leur région Fc (**Nauciel et Vildé, 2005**).

- Enzymes :

La coagulase libre est une exo-enzyme capable de coaguler le plasma. Elle entoure les corps bactériens de fibrine, ce qui les protège de la phagocytose. Une autre coagulase liée au corps bactériens fixe le fibrinogène et provoque leur agglutination (**Fauchère et Avril, 2002**).

- Toxines :

Selon **Kayser et al. (2008)**, les principales toxines produites par *S.aureus* sont :

- Hyaluronidases, lipases et ADNases.
- La leucocidine : est cytotoxique pour les granulocytes.
- Hémolysines.
- Les toxines exfoliatrices : produites par certaines souches, ont un tropisme cutané.

I.3.5. *Pseudomonas aeruginosa* :

I.3.5.1. Classification :

D'après **Denis et al. (2007)**, le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae*.

I.3.5.2. Habitat :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie répandue dans la nature, et vit dans l'eau et sur le sol. On la trouve aussi dans l'environnement hospitalier surtout dans les endroits humides (**Fauchère et Avril, 2002**). Cette bactérie peut également coloniser l'homme (**Nauciel et Vildé, 2005**).

Pseudomonas aeruginosa représente entre 60 et 80 % des souches isolées en clinique (**Monteil, 2006**).

I.3.5.3. Caractères bactériologiques :

Fauchère et Avril (2002), définissent *Pseudomonas aeruginosa* comme étant un bacille à Gram négatif, aérobie strict, oxydase positive, mobile par un flagelle polaire, température optimale de croissance de 30°C.

Pseudomonas aeruginosa se cultive facilement sur milieux ordinaires (**Denis et al., 2007**). L'une des caractéristiques de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la production d'un pigment bleu ou pyocyanine. Les souches typiques produisent aussi un pigment vert fluorescent, la pyoverdine, qui contrairement à la pyocyanine peut être produit aussi par d'autres espèces du genre *Pseudomonas* (**Fauchère et Avril, 2002**).

L'aspect des colonies est particulier. Elles sont rugueuses avec un reflet métallique. Certaines souches ont des colonies d'aspect très muqueux dû à une volumineuse et abondante substance pericellulaire, le slime (**Fauchère et Avril, 2002**).

I.3.6. Entérobactéries :

I.3.6.1. Classification :

Les *Enterobacteriaceae* ou Entérobactéries sont une vaste famille de bactéries qui sont rencontrées tous les jours en bactériologie médicale.

La famille des *Enterobacteriaceae* regroupe différents genres, les plus souvent rencontrés en pathologie sont (**Fauchère et Avril, 2002**) :

- *Escherichia, Shigella.*
- *Salmonella, Citrobacter.*
- *Proteus, Providencia, Morganella.*
- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia.*
- *Yersinia, Edwardsiella.*

I.3.6.2. Habitat :

Ce sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, retrouvées également dans l'environnement (**Grosjean et al., 2009**).

I.3.6.3. Caractères bactériologiques :

a) Caractères morphologiques : **Fauchère et Avril (2002)**, définissent les *Enterobacteriaceae* comme étant des bacilles à Gram négatif qui :

- S'ils sont mobiles, sont péritriches (cils disposés tout autour du corps bactérien).
- Poussent sur milieux ordinaires.
- Poussent en aérobie et en anaérobie.
- Réduisent les nitrates en nitrites.
- Ont une réaction d'oxydase négative.
- Utilisent le glucose par voie fermentaire.

D'après **Grosjean et al. (2009)**, *Klebsiella* et *Shigella* sont immobiles.

b) Caractères culturels :

La plupart des entérobactéries se développent bien sur les milieux habituellement utilisés en routine (**Freney et al., 2006**).

c) Caractères biochimiques :

D'après **Grosjean et al. (2009)**, les entérobactéries sont oxydase négative et catalase positive.

L'identification des entérobactéries se fait d'abord par l'étude des caractères biochimiques. Mais au sein d'une même espèce, la variabilité de certains caractères permet de différencier les souches entre elles (**Fauchère et Avril, 2002**). (Tableau II)

Tableau II : Principaux caractères biochimiques différentiels des genres et espèces bactériennes appartenant à la famille des entérobactéries (**Joly et Reynaud, 2003**).

	<i>Citrobacter</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Providencia</i>
Mobilité	+	+	-	+	+	+	+	+
Lactose	+ ou (+)	+ ou (+)	+	+	-	-	-	-
Test ONPG	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₂ S	+	-	-	-	-	+	-	-
LDC	-	d	+	-	+	-	-	-
ODC	-	d	-	+	+	+	+	-
ADH	-	d	-	+	-	-	-	-
Uréase	-	-	+	-	-	+	+	-
TDA, PDA	-	-	-	-	-	+	+	+
Indole	-	+	-	-	-	-	+	+
Citrate de Simmons	+	-	+	+	+	d	-	+
VP	-	-	+	+	+	d	-	-
Gaz / glucose	+	+	+	+	-	+	+	d

LDC : lysine-décarboxylase

ODC : ornithine-décarboxylase

ADH : arginine-dihydrolase

TDA, PDA : désaminases du tryptophane et de la phénylalanine

ONPG : orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside

VP : réaction de Voges – Proskauer

d : différent types biochimiques

+: positif en 1 à 2 jours

(+) : positif en 3 à 7 jours

- : négatif

d) Facteurs de virulence :

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, ils possèdent au niveau de leur paroi un lipopolysaccharide qui porte sur sa partie polysaccharidique des antigènes appelés O. Les flagelles portent des spécificités immunologiques appelées H. Certaines espèces possèdent aussi des antigènes capsulaires de nature polysaccharidique (antigène K). Tous ces antigènes sont de structure très variable. Ils servent ainsi à définir des sérovars (ou sérotypes) à l'intérieur d'une espèce (**Nauciel et Vildé, 2005**).

I.4. Antibiorésistance des bactéries responsables d'otites :

I.4.1. Notion de résistance :

Un micro-organisme est dit résistant lorsqu'il est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique significativement plus élevé que le taux habituel (**Meyer et al., 2004**).

La résistance se définit par l'inefficacité de la dose d'antibiotique au niveau du site infectieux : la concentration d'antibiotique est très inférieure à la CMI permettant d'arrêter la croissance de la bactérie (**Michel-Briand, 2012**).

I.4.2. Type de résistance :

Certaines espèces bactériennes sont naturellement résistantes aux antibiotiques. Par contre, nous constatons régulièrement que des bactéries, initialement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes (**Michel-Briand, 2009**).

La résistance naturelle est l'existence d'un ou de plusieurs mécanismes de résistance innés, donc propre à l'espèce bactérienne. Alors que la résistance acquise est l'acquisition d'un mécanisme de résistance pour une souche d'une espèce habituellement sensible (**Philippon, 2008**).

I.4.3. Profil de résistance des principales bactéries responsables d'otites :

I.4.3.1. *Staphylococcus aureus* :

Les souches communautaires sont généralement résistantes aux pénicillines G et A, mais sensibles aux pénicillines M (et aux céphalosporines). Elles sont souvent sensibles aux macrolides, aux synergistines, aux fluoroquinolones. Parmi les souches isolées en milieu hospitalier et en communautaire, environ un tiers sont résistantes à toutes les β -lactamines (souches méti-R) et sont en règle multirésistantes. Souvent seuls les glycopeptides restent

actifs sur ces souches. En outre quelques souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides commencent à apparaître (Nauciel et Vildé, 2005).

I.4.3.2. *Streptococcus pneumoniae* :

Le pneumocoque est une espèce naturellement sensible à la plupart des antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif : bêta lactamines, macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, rifampicine, cotrimoxazole, glycopeptides. Les antibiotiques de référence restent les bêta lactamines (Brisou et al., 2004).

I.4.3.3. *Haemophilus influenzae* :

La bactérie est sensible à de nombreux antibiotiques, mais un pourcentage important de souches a acquis une bêta- lactamase qui les rend résistantes aux aminopénicillines (Nauciel et Vildé, 2005).

Cette bêta-lactamase est inhibée par l'acide clavulanique, et inactive sur les céphalosporines. Toutes les souches sont sensibles aux fluoroquinolones (Fauchère et Avril, 2002).

I.4.3.4. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie généralement multirésistante. Les antibiotiques pouvant avoir une bonne activité sont : la ticarcilline, la pipéracilline, l'azlocilline, la ceftazidime, la cefsulodine, le céfépime, l'imipénème, et les aminosides. Les souches résistantes à la colistine sont très rares. La ciprofloxacine est la plus active des quinolones (Fauchère et Avril, 2002).

I.4.3.5. Entérobactéries :

Les entérobactéries sont naturellement sensibles à de nombreux antibiotiques. Cependant, il existe certaines résistances naturelles spécifiques de certains genres (Joly et Reynaud, 2003).

Certaines espèces bactériennes telles que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae* sont naturellement résistantes à la pénicilline G (Philippon, 2008).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre étude a été effectuée au niveau de l'unité de Microbiologie du laboratoire central du CHU de Blida unité Frantz Fanon, et a porté sur l'ensemble des prélèvements auriculaire reçus.

L'étude a concerné 105 prélèvements de pus auriculaire reçus du service ORL, en plus d'une étude rétrospective s'étalant sur une période de trois années.

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel non biologique :

Il est représenté par :

Verrerie, tubes à essai, boîtes de Petri, écouvillons, lames et lamelles, eau physiologique, eau oxygénée, milieux de culture, étuve, autoclave, jarre, bec bunsen, densitomètre, galeries d'identifications, réactifs, antibiotiques, distributeur d'antibiotiques, disques d'oxydase.

(Annexe N°1)

II.1.2. Matériel biologique :

Le matériel biologique est représenté par les souches de référence et les prélèvements reçus et ayant fait l'objet de cette étude.

II.1.2.1. Souches de références :

Les souches de référence du laboratoire et qui sont utilisées au cours de notre travail sont fournies par l'institut Pasteur d'Algérie, et sont mentionnées dans le tableau ci-après :

Tableau III : Différentes souches de références utilisées.

Souches	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA -	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA +	ATCC 43300
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619

II.1.2.2. Echantillons :

Les échantillons sont constitués de pus d'origine auriculaire, provenant de malades hospitalisés ou consultant à titre externe. Le pus est recueilli soit par écouvillonnage du

conduit auditif grâce à un écouvillon stérile, ou à l'aide d'une seringue par aspiration du liquide après paracentèse sans contaminer le prélèvement par la flore du conduit auditif externe.

II.2. Méthodes :

Une fois le prélèvement de pus est transféré au laboratoire dans un délai inférieur à 2 heures à température ambiante, rattaché par une fiche de renseignements (Annexe N°03), une analyse bactériologique est effectuée dont les étapes sont représentées dans la figure suivante :

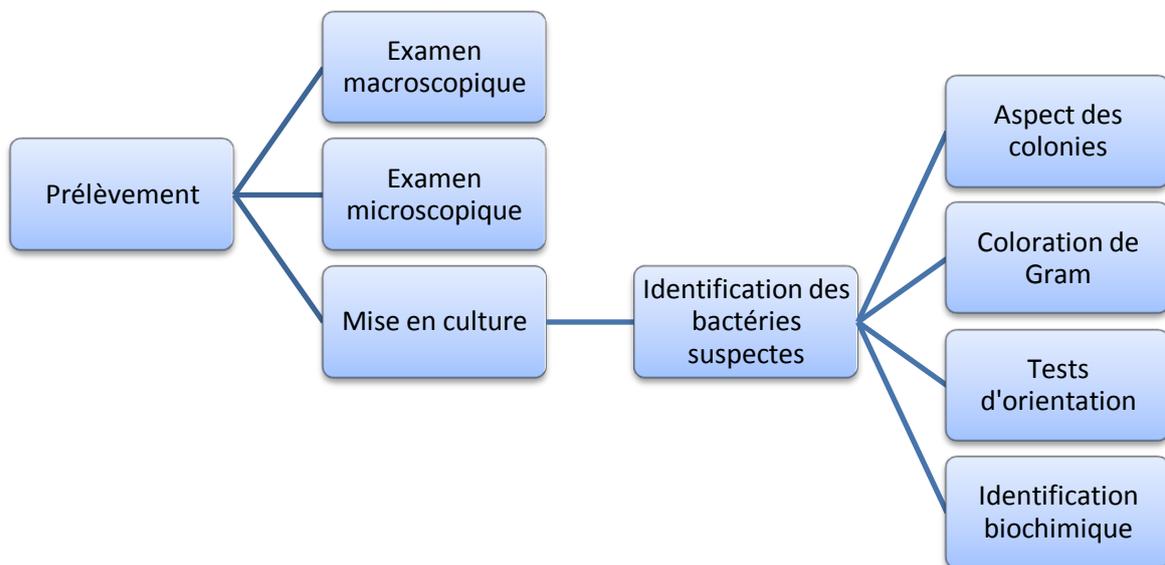


Figure N°2 : Les étapes essentielles de l'analyse bactériologique.

II.2.1. Examen macroscopique :

L'observation du prélèvement à l'œil nu nous montre l'aspect macroscopique du prélèvement : hématique, purulent.

II.2.2. Examen microscopique :

L'examen microscopique reste un acte fondamental du diagnostic bactériologique. Il comporte un examen à l'état frais et après coloration.

II.2.2.1. Examen à l'état frais :

a. Principe :

C'est une méthode rapide qui consiste à observer le prélèvement entre lame et lamelle à l'objectif 40.

b. Technique :

La technique est réalisée à partir de l'écouvillon humidifié par l'eau physiologique. Il faudra homogénéiser le prélèvement liquéfié, puis prélever une goutte de suspension. Ensuite, on dépose la goutte de suspension au centre d'une lame propre, et on la recouvre d'une lamelle en partant d'une position inclinée de 45°.

c. Lecture :

Observation se fait à l'objectif x 40.

- S'effectue essentiellement pour observer la réaction inflammatoire : présence de lymphocytes, mais également la présence d'hématies, cellules épithéliales.
- Visualisation de la mobilité des bactéries.
- Présence ou absence de levures.

II.2.2.2. Examen après coloration au bleu de méthylène :

Dans certains cas où le prélèvement est purulent et marqué par la présence de leucocytes à l'état frais, on fait appel à la coloration au bleu de méthylène pour réaliser l'équilibre leucocytaire.

a. Principe :

La coloration au bleu de méthylène est une coloration très simple qui permet d'observer la présence de polynucléaires et de lymphocytes et les différencier les uns des autres : les polynucléaires sont de grosses cellules à cytoplasme riche en granules qui prennent la couleur du colorant les rendant faciles à reconnaître. Alors que les lymphocytes sont de taille plus petite que les polynucléaires, avec un gros noyau occupant la majeure partie du cytoplasme.

b. Technique :

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène pendant 5 à 10 minutes.
- Rincer à l'eau distillée puis sécher la lame.

c. Lecture :

Examiner à l'objectif x100 à immersion (avec une goutte d'huile) avec un éclairage important (diaphragme ouvert).

Toutes les cellules apparaissent colorées en bleu, ce qui nous mène à distinguer :

- Les polynucléaires : ont un noyau polylobé qui prend la couleur bleu, d'où l'observation de granules bleus après coloration.
- Lymphocytes : sont de taille moindre que les polynucléaires, et se caractérisent par leur gros noyau qui prend la coloration bleu.
- Cellules épithéliales : leurs noyaux se colorent en bleu aussi mais ces dernières sont de taille supérieure que les polynucléaires et les lymphocytes.

II.2.3. Mise en culture :

On ajoute du bouillon cœur-cerveille (BHIB) à l'écouvillon pour enrichir le prélèvement, et on peut l'incuber dans l'étuve à 37°C pendant 20 minutes avant la mise en culture sur milieux solides.

Dans le cas où le pus est prélevé par une seringue, on ensemence directement sans ajouter de l'eau physiologique ou du BHIB, en mettant une goutte du prélèvement dans chaque boîte pétri.

Il s'agit d'ensemencer les milieux de culture appropriés (Annexe N°01):

- Gélose au sang cuit pour les germes exigeants.
- Milieu Hecktoen sélectif pour les bacilles Gram négatif.
- Milieu Chapman sélectif pour les staphylocoques.

On ensemence dans ces milieux en pratiquant des stries dans le premier quadrant par l'écouvillon et à l'aide d'une pipette Pasteur, on refait les stries pour avoir 3 ou 4 quadrants. Incuber les boîtes à 37°C en atmosphère normale pour les milieux Hecktoen et Chapman, et sous CO₂ pour les géloses au sang cuit. La durée d'incubation est de 24 à 48 heures.

II.2.4. Identification des colonies suspectes :

II.2.4.1. Aspect des colonies :

S'il y a présence de colonies, on distingue les différents types et on les différencie selon leur taille, aspect et couleur.

II.2.4.2. Coloration de Gram :

Principe : Le principe de la coloration de Gram réside en la mise en évidence des propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer les bactéries et les classer en Gram positif ou Gram négatif.

Elle permet aussi de renseigner sur la forme, la taille et le mode de regroupement des bactéries.

Technique : (Annexe N°02).

Lecture : Les bactéries à Gram positif doivent apparaître colorées en violet, et les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose.

II.2.4.3. Les tests d'orientation :

a. Test de la catalase :

- **Principe :** Recherche de bactéries capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène grâce à l'enzyme catalase. $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

- **Technique :** • Sur une lame propre et sèche déposer une goutte d'eau oxygénée.
• A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien.

- **Lecture :** L'observation est immédiate. S'il y a un dégagement gazeux de dioxygène (présence de bulles): catalase +, et s'il n'y a pas de bulles : catalase -.

b. Test de l'oxydase :

- **Principe :** La recherche d'oxydase est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles Gram-.

- **Technique :** • Sur une lame propre et sèche déposer le disque d'oxydase.
• On prend une colonie à l'aide d'une pipette, et on la dépose sur le disque.

- **Lecture :**

Si la couleur de la colonie est violette on dit qu'elle est oxydase +, sinon s'il n'y a pas de virage de couleur on dit qu'elle est oxydase -.

Les bactéries recherchées au cours des différentes pathologies atteignant l'oreille sont indiquées dans le tableau I.

II.2.4.4. Identification biochimique :

a. Galerie classique :

- **L'étude de la dégradation du lactose :**

On utilise l'ONPG ou Ortho-Nitro-Phényl-pyranogalactoside, pour la recherche d'une β -galactosidase.

- Réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.
- Ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG.
- Incuber 30 min à 37°C.
- Lecture : Milieu jaune : ONPG + / Milieu sans couleur : ONPG – .

- **Mise en évidence de la fermentation des sucres :**

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu TSI se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). Une alcalinisation se révèle par une coloration rouge foncé.

La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire.

La gélose TSI (figure N°03) fournit quatre renseignements principaux :

- Fermentation de glucose : le culot rouge indique un glucose non fermenté, et le culot jaune : glucose fermenté.
- Fermentation du lactose et/ou du saccharose :
Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés.
Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s).
- Production de gaz : Apparition de gaz dans le culot qui se traduit par la formation de bulles ou par un décollement de la gélose.
- Formation d'H₂S : Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

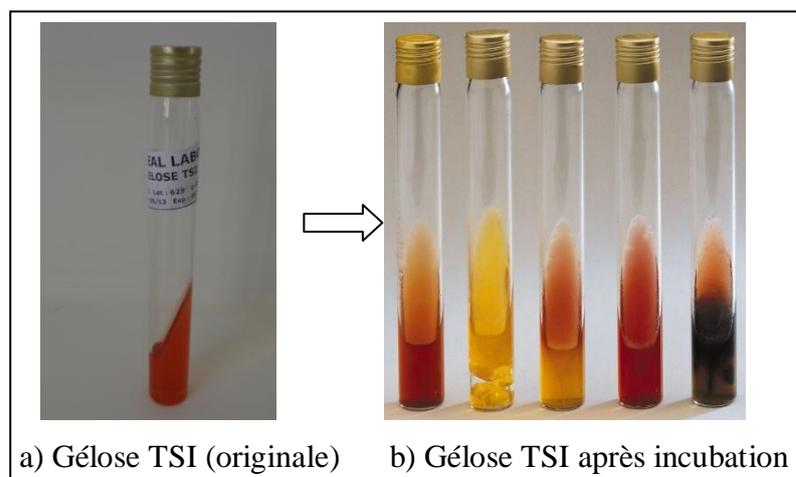


Figure N°03 : Mise en évidence de la fermentation des sucres.

- **Recherche de métabolites formés à partir de l'acide pyruvique :**

A partir du milieu Clark-Lubs contenant de l'acide pyruvique, la formation d'acide formique et d'acide acétique (réaction de rouge de méthyle, RM) et la formation d'acétoïne (réaction de Voges-Proskauer, VP) est étudiée.

Le bouillon est divisé en deux où on ajoute au premier tube le réactif rouge de méthyle, s'il y a virage de sa couleur en rouge on dit qu'il est positif, et s'il reste jaune la réaction est négative.

On ajoute au deuxième tube les réactif VP I (NaOH ou KOH) et VP II (alpha-naphtol) , et on le laisse ouvert 10 minutes incliné sur le bec bunsen pour une bonne oxygénation.

La couleur jaune indique une réaction négative, alors que la couleur rose claire indique une réaction positive.

- **Test Uréase :**

Se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. C'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreuses bactéries, notamment parmi les *Enterobacteriaceae*.

On prépare une suspension en milieu Urée-tryptophane, et incubé dans l'étuve. La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium : uréase+, et si le milieu est orange alors pas d'alcalinisation : test uréase -.

- **Test Indole :**

Le test indole sert à déterminer si la bactérie produit de l'indole à partir du tryptophane. Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane, et l'incuber. Ajouter le réactif de Kovacs et lire : formation d'un anneau rouge : indole +, ou absence de coloration rouge : indole -.

- **Utilisation du citrate de simmons comme unique source de carbone :**

Le milieu au citrate de simmons est un milieu semi solide incliné dans un tube et qui contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromotymol. L'ensemencement se fait par des stries en surface de la gélose.

Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur gélose et le plus souvent cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniac à partir des sels d'ammonium ce qui se traduit par un virage du bleu de bromotymol du vert au bleu.

- **Recherche de décarboxylases :**

Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées : la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH). Les tests correspondants sont présents notamment sur la galerie API. Le test individuel peut être effectué sur le milieu de Moeller Falkow contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine, soit l'ornithine, soit l'arginine), du glucose et un indicateur coloré, le pourpre de bromocrésol.

La réaction s'effectue en deux temps. Lorsque le glucose est fermenté, il y a virage au jaune du pourpre de bromocrésol, lorsque l'acide aminé est décarboxylé, il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet. Après 18 heures à 37°C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive.

b. Galerie API :

C'est un système standardisé pour l'identification des bactéries. Comprenant en général 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Il existe plusieurs types de galeries selon les germes à rechercher :

- API 20E pour l'identification des entérobactéries.
- API 20NE pour l'identification des Pseudomonas.
- API STAPH pour l'identification des staphylocoques.
- API STREPTO pour l'identification des streptocoques.
- API NH pour l'identification des Haemophilus et Neisseria.

Principe :

Galerie de 20 microtubes contenant des milieux déshydratés, dans lesquelles la suspension bactérienne doit être introduite et dissout les substrats déshydratés.

Les réactions produites pendant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Technique :

Tout d'abords, on hydrate la galerie par de l'eau physiologique, et une suspension bactérienne d'une opacité de 0,5 Mac Farland doit être préparée.

L'ensemencement de la galerie se fait par une pipette Pasteur pour introduire la suspension bactérienne dans chaque tube. La pointe de la pipette est appuyée à l'intérieur et sur le côté du tube pour éviter la formation de bulles.

Certains microtubes doivent être remplis complètement, d'autres sont partiellement remplis, alors que d'autres sont recouverts d'huile de vaseline.

Incuber la galerie API pendant 18 à 24 heures à 37°C, la durée d'incubation diffère selon le type de la galerie.

Lecture : Après incubation, on observe un virage de couleur des microtubes. La lecture de la galerie se fait après l'addition des réactifs, et en se référant au tableau de lecture qui se trouve dans le prospectus, ou à l'aide du logiciel API WEB.

II.2.4.5. Identification antigénique :

a. Streptocoques :

Il s'agit d'un test d'agglutination au latex pour l'identification des streptocoques des groupes A, B, C, D, F et G. (Figure N°04)



Figure N°04 : Kit d'agglutination des streptocoques (Originale).

La majorité des streptocoques pathogènes possèdent des antigènes spécifiques polysaccharidiques permettant leur classification en groupes. Après extraction, ces antigènes peuvent être recherchés avec des particules de latex sensibilisées par des immunoglobulines spécifiques, qui agglutinent en présence de l'antigène correspondant.

Déposer une goutte de chaque réactif au latex sur les cercles de la carte sans oublier le témoin positif, et ajouter une colonie dans chaque cercle en mélangeant avec un agitateur fourni dans le kit. La présence d'agglutination dans l'un des cercles indique le groupe du Streptocoque.

b. Staphylocoques :

Le test d'agglutination au latex permet de mettre en évidence les constituants externes spécifiques de *Staphylococcus aureus*, ce qui les différencie des staphylocoques à coagulase négative.

S. aureus possède dans sa paroi des récepteurs au fibrinogène et des protéines A. Leur recherche est donc un critère important d'identification. Cette recherche se réalise par une simple réaction d'agglutination en présence de colonies de *S. aureus* et de particules de latex sensibilisées avec du fibrinogène, des anticorps anti-globules rouges. (Figure N°05)



Figure N°05 : Kit d'agglutination pour l'identification antigénique des staphylocoques (originale).

Déposer une goutte dans le cercle de la carte et ajouter à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie des staphylocoques, et mélanger. On compare le résultat avec le témoin positif. Si on observe une agglutination, la colonie est *S. aureus*, et en son absence on dit que ce sont des staphylocoques à coagulase négatif.

II.2.4.6. Recherches spécifiques :

Test de satellitisme :

Devant des bactéries appartenant au genre *Haemophilus*, un test de satellitisme peut être effectué pour savoir s'il s'agit d'un *Haemophilus influenzae*.

On ensemence la suspension bactérienne dans un milieu de gélose au sang frais par écouvillonnage. Après, on ensemence une souche de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en une seule strie au milieu de la boîte. La durée d'incubation est de 24h à 37°C.

Lecture : observation du développement de colonies d'*H. influenzae* à proximité de la strie de *S. aureus* à cause de cette dernière qui apporte le facteur V (NAD) à l'*Haemophilus*

influenzae. Au cas contraire, s'il n'y a pas de pousse près de la strie, le germe en question n'est pas *Haemophilus influenzae*.

II.2.5. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries incriminées :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques s'effectue selon les recommandations du CLSI (2011) :

II.2.5.1. Par diffusion des disques (Technique de diffusion de l'antibiotique sur milieu gélosé):

a. Milieu pour l'antibiogramme :

- Milieu Mueller Hinton coulé en boîtes de Petri pour les bactéries non exigeantes.
- Mueller Hinton au sang pour les bactéries exigeantes.

b. Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 heures sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une pipette Pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Dans certains cas il faudra utiliser un écouvillon pour prélever plus facilement les colonies bactériennes (dans le cas d'*Haemophilus spp.* et *Streptococcus spp.*).
- Bien décharger la pipette ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile, et homogénéiser la suspension bactérienne. A l'aide d'un densitomètre, il faudra vérifier son opacité qui doit être équivalente à 0,5 MF.

c. Ensemencement :

- Tremper l'écouvillon stérile dans l'inoculum et l'essorer en le pressant contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. Il faudra répéter l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même, et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faudra recharger l'écouvillon à chaque fois.

d. Application de disques d'antibiotiques :

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte.
- Déposer et presser chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile et ne pas déplacer les disques après application.

- La liste des antibiotiques à tester selon les bactéries figure dans les tableaux ci-dessous:

Tableau IV : Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries non exigeantes (RAHAL et al., 2011).

Entérobactéries	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
Ampicilline (10µg)	Ticarcilline (75µg)	Ticarcilline (75µg)	Pénicilline (10UI)
Amoxicilline + Acide clavulanique (20/10µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg)	Oxacilline (1µg)
Céfalotine (30µg)	Pipéracilline (100µg)	Pipéracilline (100µg)	Céfoxitine (30µg)
Céfazoline (30µg)	Céftazidime (30µg)	Céftazidime (30µg)	Amikacine (30µg)
Céfoxitine (30µg)	Aztréonam (30µg)	Imipénème (10µg)	Gentamicine (10 µg)
Céfotaxime (30µg)	Imipénème (10µg)	Amikacine (30µg)	Kanamycine (30µg)
Imipénème (10µg)/ Méropénème (10µg)	Amikacine (30µg)	Gentamicine (10µg)	Erythromycine (15µg)
Ertapénème (10µg)	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)	Clindamycine (2µg)
Amikacine (30µg)	Tobramycine (10µg)	Nétilmicine (CMI seulement)	Pristinamycine (15µg)
Gentamicine (10µg)	Nétilmicine (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Ofloxacine (5µg)
Acide nalidixique (30µg)	Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Chloramphénicol (30µg)
Ciprofloxacine (5µg)	Lévofloxacine (5µg)	Doxycycline (30µg)	Vancomycine (CMI seulement)
Colistine (10µg)	Fosfomycine (50µg) +50µg G6P	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Teicoplanine (30µg)
Chloramphénicol (30µg)	Rifampicine (30µg)	Colistine (CMI seulement)	Rifampicine (5µg)
Furanes (300µg)	Colistine (10µg)	Rifampicine (30µg)	Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)
Triméthoprim + sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)			Tétracycline (30µg)
Fosfomycine (200µg)			Acide fusidique (10µg)
			Fosfomycine (50µg)

Tableau V: Liste des antibiotiques à tester pour les bactéries exigeantes (RAHAL et al., 2011).

<i>Haemophilus spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus spp.</i> Groupe viridans	<i>Streptococcus</i> β-hemolytique
Ampicilline (10µg)	Penicilline (CMI)	Penicilline (CMI)	Penicilline (10UI)
Ampicilline	Oxacilline (1 µg)	Ampicilline (CMI)	Ampicilline* (10UI)
Amoxicilline+ Ac clavulanique (20/10 µg)	Amoxicilline pour autre que LCR (CMI)	Cefotaxime (30µg)	Erythromycine (15µg)
Cefalotine (30µg)	Cefotaxime (CMI)	Pristinamycine (15µg)	Clindamycine (2µg)
Cefotaxime (30µg)	Imipeneme (CMI)	Tetracycline (30µg)	Pristinamycine (15µg)
Tetracycline (30µg)	Erythromycine (15µg)	Gentamicine (CMI pour infections graves)	Tetracycline (30µg)
Azithromycine (15µg)	Clindamycine (2µg)	Vancomycine (30µg)	Levofloxacin (5µg)
Acide nalidixique (30µg)	Pristinamycine (15µg)	Chloramphenicol (30µg)	Vancomycine (30µg)
Ofloxacin (5µg)	Chloramphenicol (30µg)	Rifampicine (30µg)	Chloramphenicol (30µg)
Chloramphenicol (30µg)	Rifampicine (5µg)	Erythromycine (15µg)	Gentamicine (500µg)
Trimethoprim + sulfamethoxazole (1.25/23.75µg)	Trimethoprim + sulfamethoxazole(1.25/23.75µg)	Levofloxacin (5µg)	Rifampicine (30µg)
	Vancomycine (30µg)	Clindamycine (2µg)	
	Levofloxacin (5µg)		
	Tetracycline (30µg)		
	Fosfomycine (50µg)		

e. Conditions d'incubation :

Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandée pour chaque bactérie. (Annexe N°06)

f. Lecture :

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse, et Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes (Annexe N°10). Enfin classer les bactéries dans l'une des catégories : sensibles, résistantes ou intermédiaires.

II.2.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Définition :

CMI ou concentration minimale inhibitrice, est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne.

Techniques :

Deux techniques sont utilisées pour déterminer la CMI :

- Technique de dilution en milieu gélosé.
- E-test.

a. Technique de dilution en gélose :

Milieu de culture :

Le milieu Mueller Hinton est liquéfiée puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.

Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotiques :

Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique et la diluer dans le volume d'eau distillé approprié pour obtenir une concentration de 5120µg/ml (solution- mère), et procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans le solvant approprié jusqu'à la concentration finale de 1,25µg/ml.

Répartir 2ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée, et ne pas changer de pipette, et compléter chaque boîte avec 18 ml de gélose liquéfiée et homogénéisée.

La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512µg/ml à 0,125µg/ml.

Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile. (Annexe N°08)

Préparation de l'inoculum bactérien :

Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5MF, en utilisant l'eau physiologique.

Disposer sous forme de spots de 5 à 8mm de diamètre à la surface de la gélose, à l'aide d'une pipette automatique à cône stérile, et marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.

Commencer par le témoin puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la plus élevée en terminant l'application des spots sur une deuxième boîte témoin.

Étaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incubé une nuit (détection des cultures mixtes, et obtention d'une culture jeune).

Incubation :

Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 minutes). Renverser les boîtes et incubé à $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 15 à 20h.

Lecture des CMI :

Placer les boîtes sur une surface sombre et noter la CMI.

Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film.

Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test. Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes. Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

Exemple : cette technique est utilisée pour la recherche de la CMI de l'oxacilline et la vancomycine chez *S.aureus*.

b. Technique du E-Test :

C'est une technique de détermination de la CMI, validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes.

L'ensemencement se fait par la technique classique de l'antibiogramme.

Dépôt de la bandelette E-test : Prélever la bandelette à l'aide d'une pince préalablement flambée au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E.

Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée. Éviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, et une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte.

Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus et l'incuber dans les conditions requises selon la nature de la bactérie testée.

Lecture et interprétation : La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, et correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test. Il faudra lire ensuite la CMI de la souche bactérienne testée, et comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques.

Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

Exemple : Le E-test est utilisé pour déterminer la CMI des bêta-lactamines chez *Streptococcus pneumoniae*.

II.2.5.3. Recherches complémentaires :

a. Recherche de la résistance de *Staphylococcus spp.* à l'oxacilline :

La mutation des PLP confère au Staphylocoques une résistance à toutes les bêtalactamines. Pour *Staphylococcus aureus*, le disque de céfoxitine est comparable à celui de l'oxacilline pour détecter la résistance à l'oxacilline; cependant, le disque de céfoxitine est plus facile à lire et donc c'est la méthode préférée.

Pour les staphylocoques à coagulase négative, le test à la céfoxitine doit être utilisé pour prédire la résistance à l'oxacilline.

En pratique, pour une meilleure détection de la résistance, les disques d'oxacilline (1µg) et de céfoxitine (30µg) doivent être testés simultanément au niveau de l'antibiogramme standard de *S. aureus*.

Tableau XIV : Recherche de la résistance à l'oxacilline et interprétation des tests (méthode de diffusion des disques) (**Rahal et al., 2011**).

	Oxacilline (1µg)	Céfoxitine (30µg)	Interprétation
<i>S. aureus</i>	≥ 13 mm	≥ 22 mm	Souche OXA S
	≤ 12 mm	≤ 21 mm	Souche OXA R
Autres SCN	---	≥ 25 mm	Souche OXA S
	---	≤ 24 mm	Souche OXA R

b. Recherche de la bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE):

Définition d'une BLSE :

Les BLSE désignent des enzymes « bêta-lactamases » produites par les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* entraînant une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des

monobactames (aztréonam), mais n'ayant aucune activité vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, moxalactam) ni des carbapénèmes (imipénème).

➤ **Test de synergie :**

- **Pour les entérobactéries :**

Technique : La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque d'amoxicilline+acide clavulanique (AMC 20/10µg) à 30mm centre à centre d'un disque de C3G (Cefotaxime : CTX 30µg ou Ceftriaxone : CRO 30µg). Incuber 18H à 35°C.

Lecture : La production d'enzyme peut se traduire par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- AMC et CTX - AMC et CAZ - AMC et ATM

En l'absence d'une image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution du diamètre autour des disques de C3G.

- **Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter spp.* :**

Technique : La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque de ticarcilline+acide clavulanique (TCC 75/10µg) à 30mm (centre à centre) d'un disque de C3G : céftazidime (CAZ 30µg), aztréonam (ATM 30 µg), céfépime (FEP 30 µg).

La durée d'incubation est de 18h à 35 °C.

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie ou « bouchon de champagne » entre les disques :

- TCC et CAZ - TCC et ATM - TCC et FEP

➤ **Test de confirmation ou technique du double disque:**

Technique :

Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

L'application des disques d'antibiotiques pour les entérobactéries, se fait par dépôt d'un disque d'AMC et un disque de C3G (CTX ou CRO) à une distance de 30mm, et laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante et couvercle de la boîte vers le haut.

Après 1h d'incubation, ôter le disque d'AMC et le remplacer par un disque de CTX ou CRO (ou CAZ) et incuber la boîte 18 H à 35°C.

Lecture et interprétation :

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G appliqué après diffusion du disque AMC ou TCC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G. L'interprétation (R, I ou S) se fait selon les diamètres mesurés.

Exemple : diamètre de CTX = 16 mm ; diamètre de CTX+AMC = 21 mm donc souche BLSE(+).

c. Recherche de la pénicillinase par le test de trèfle :

Ce test se fait sur une souche de *Haemophilus influenzae* pour rechercher la présence d'une pénicillinase.

On ensemence par écouvillonnage une suspension de 0,5 MF de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pénicillinase -, sur une gélose au sang cuit, et on applique un disque d'ampicilline au centre de la boîte.

Ensemencer une strie d'une souche de *S. aureus* ATCC 43300 pénicillinase +, une deuxième strie de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pénicillinase-, et on finit par une strie de la souche d'*Haemophilus influenzae* à tester.

La durée d'incubation est de 24h à 35°C sous CO₂.

Lecture : rechercher une image de feuille de trèfle formée entre la souche d'*Haemophilus*, la souche de *S. aureus* pénicillinase +, et l'induction d'une culture de la souche de *S. aureus* pénicillinase - jusqu'au disque de l'ampicilline.

Si l'image est présente : la souche est bêtalactamase +.

Si l'image est absente : la souche est bêtalactamase - .

II.2.5.4. Contrôle de qualité :

Pour chaque espèce bactérienne testée, un contrôle de qualité est réalisé de façon hebdomadaire dans les mêmes conditions à l'aide des souches de références ATCC pour tester l'efficacité des antibiotiques et la fiabilité de l'antibiogramme.

II.2.6. Conservation des souches :

Les raisons de conserver des souches sont d'ordre varié. Il peut s'agir soit d'une collection dans le cadre purement hospitalier, soit dans un objectif de recherche ou d'enseignement.

Avant d'être conservées, les bactéries doivent être obtenues en culture pure. Elles doivent durant la durée stockage, être dans des conditions de non multiplication, en milieu solide et protecteur et doivent être effectuées sur une culture récente.

Lorsque la conservation est de courte durée, elle consiste le plus souvent à effectuer des repiquages sur milieu gélosé en tube et conservation à l'obscurité à température ambiante. Lorsqu'il devient nécessaire de réutiliser la souche, celle-ci est mise en subculture sur un nouveau milieu.

Durant notre études certaines souches ont été conservées tels que : *Pseudomonas aeruginosa* résistante à l'imipénème, *Staphylococcus aureus* MRSA +.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats obtenus se répartissent sur deux volets :

- Les résultats de l'étude rétrospective qui s'est étalée sur une période de trois années allant de Janvier 2010 à Décembre 2012. L'exploitation des résultats des examens cyto bactériologiques des pus d'oreilles reçus était possible grâce au logiciel WHONET 5.6.
- Les résultats de l'étude prospective, cette dernière ayant duré 05 mois (de Février à Juin 2013).

III.1. Résultats :

III.1.1. Résultats de l'étude rétrospective :

Les données de l'étude rétrospective ont permis de recenser 300 cas positifs (51 cas en 2010, 89 cas en 2011 et 160 cas en 2012). Ces données sont répertoriées dans le tableau ci-dessous :

Tableau VII: Résultats de l'étude rétrospective.

Cas positifs		2010	2011	2012
		n= 51 nombre %	n= 89 nombre %	n= 160 nombre %
Sexe	Masculin	26 (51 %)	53 (60 %)	92 (58 %)
	Féminin	25 (49 %)	36 (40 %)	68(42 %)
Services	Externes	46 (90 %)	72 (81 %)	154 (96 %)
	Internes	5 (10 %)	17 (19 %)	6 (4 %)
Espèces dominantes		- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 11 souches (21,56%) - <i>Staphylococcus aureus</i> 9 souches (17,64 %) - <i>Haemophilus sp.</i> 7 souches (13,72%)	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19 souches (21,34 %) - <i>Staphylococcus aureus</i> 18 souches (20,22%) - <i>Proteus mirabilis</i> 9 souches (10,11%)	- <i>Staphylococcus aureus</i> 36 souches (22,5 %) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32 souches (20%) - <i>Proteus mirabilis</i> 10 souches (6,25%)

III.1.1.1. Répartition des germes isolés des pus d'oreille selon les cas externes/internes :

Les résultats montrent que les bactéries incriminées proviennent dans la plupart des cas de patients consultants à titre externe (90% en 2010, 81% en 2011 et 96% en 2012). Le reste des cas positifs a été identifié chez les patients hospitalisés (internes).

III.1.1.2. Répartition des espèces bactériennes isolées :

La répartition des germes selon les espèces bactériennes illustrées par les figures ci-dessous montre que les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* arrivent en tête durant les trois années.

En 2010, l'espèce prédominante est *Pseudomonas aeruginosa* qui dénombre 11 souches isolées soit 21,56% des souches. Durant la même année, 09 souches de *Staphylococcus aureus* ont été isolées soit 17.64% des souches, suivie de l'espèce *Haemophilus sp.* comptant 07 souches isolées (13.72%). (Figure N°06)

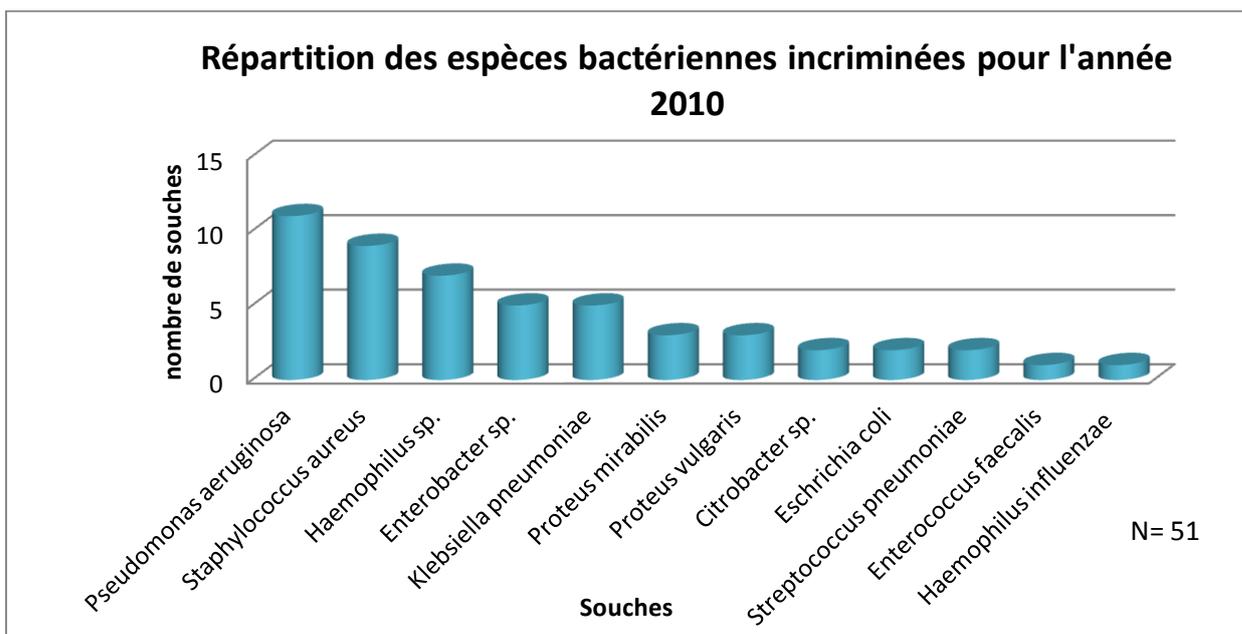


Figure N° 06 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2010.

En 2011, *Pseudomonas aeruginosa* isolé 19 fois arrivent en tête des souches incriminées avec un taux égal à 21,34%. *Staphylococcus aureus* occupe la seconde position avec 18 souches isolées soit un taux de 20,22%.

D'autres souches ont été isolées comme *Proteus mirabilis* (09 souches) avec un taux de 10,11%, et *Haemophilus sp.* et *Streptococcus sp.* au nombre de 6 souches chacune. (Figure N°07)

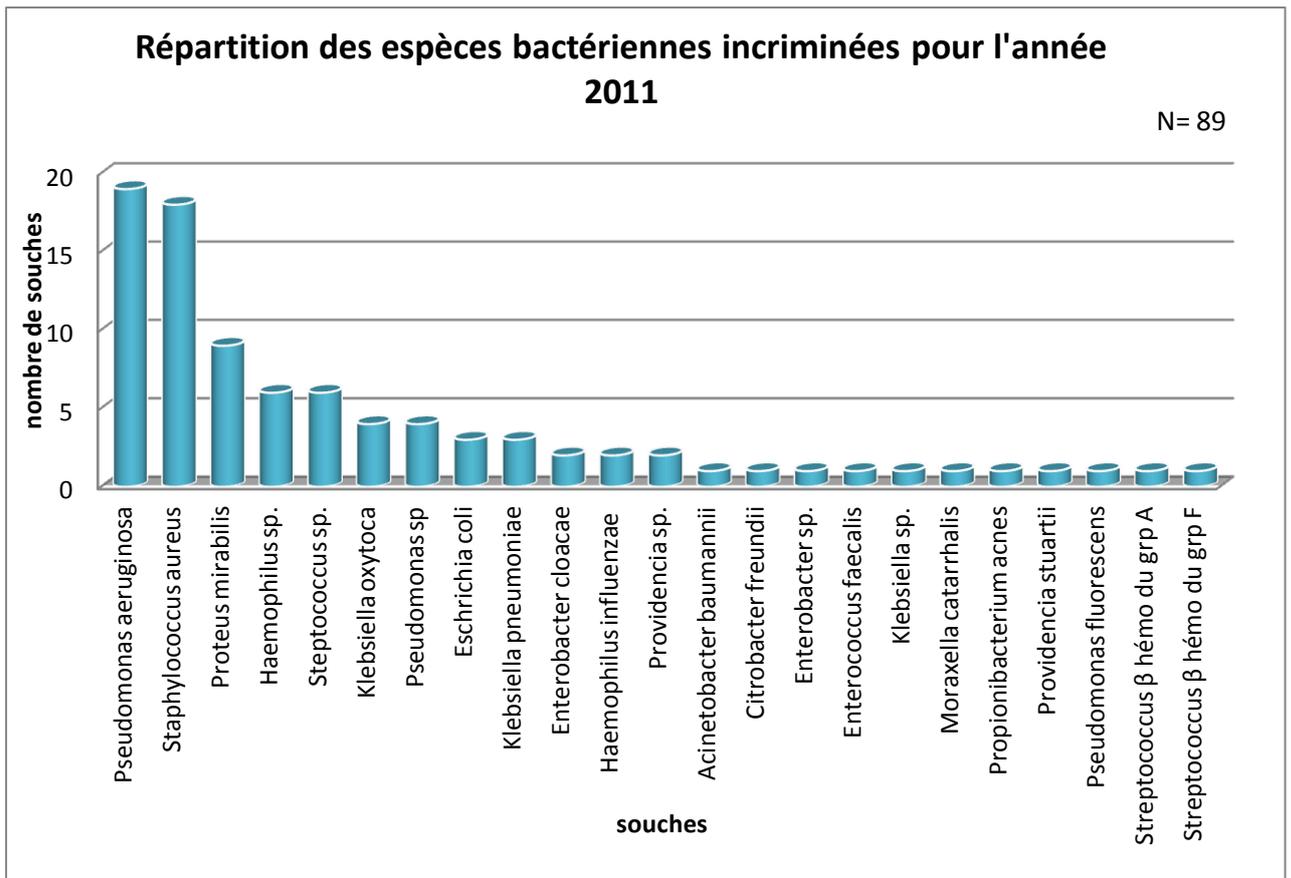


Figure N° 07 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2011.

En 2012, 36 souches isolées soit 22,5% des isolats appartiennent à *Staphylococcus aureus*, alors que 32 souches (20% des isolats) de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées durant cette année.

D'autres souches ont été isolées comme, *Proteus mirabilis* (10 souches) avec un taux de 6,25%, et *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Streptococcus sp.* avec 6 souches chacune (3.75%). (Figure N°08)

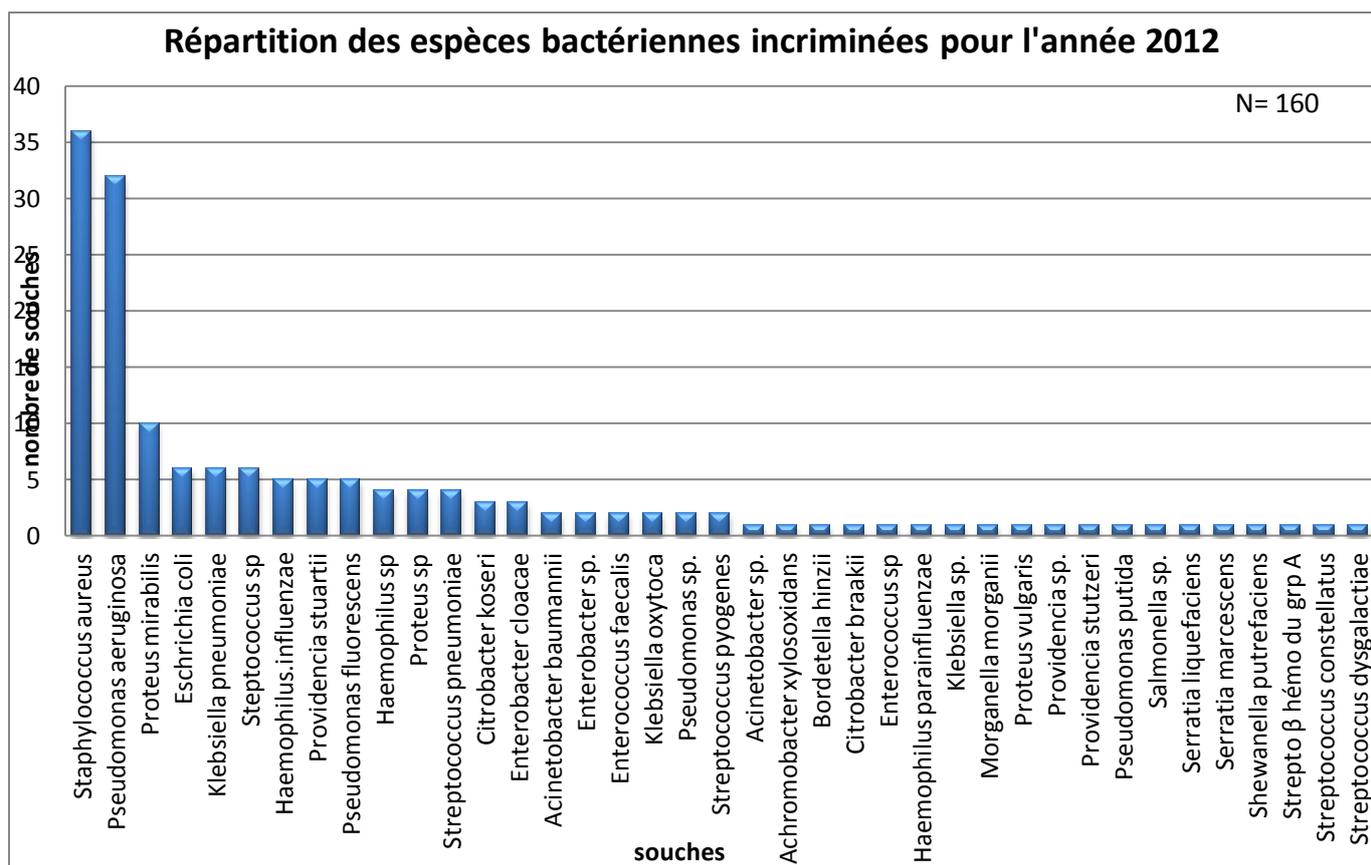


Figure N° 08 : Répartition des espèces bactériennes incriminées pour l'année 2012.

III.1.2. Résultats de l'étude prospective :

Les résultats de l'étude prospective concernent 105 prélèvements de pus auriculaires provenant de malades ayant consulté le service ORL de l'hôpital. Cette étude est réalisée en se référant aux fiches de résultats et au registre des résultats du laboratoire.

III.1.2.1. Répartition des prélèvements selon les services pourvoyeurs:

Durant la période d'étude (5 mois), nous avons reçu 105 prélèvements parmi lesquels 104 (99%) sont issus de sujets consultants à titre externe. Un seul prélèvement (1%) provenait d'un patient hospitalisé au niveau du service ORL. (Tableau VIII)

Tableau VIII : Répartition des consultants selon les services pourvoyeurs.

Malades	Nombre
Externes	104
Hospitalisés	1

III.1.2.2. Répartition des pus auriculaires selon le mode de prélèvement :

Les prélèvements reçus au niveau du laboratoire ont été majoritairement effectués par écouvillonnage. Sur 105 prélèvements, 104 ont été recueilli par écouvillonnage voir 99 %. Seulement un seul prélèvement était fait par ponction à la seringue (1 %).

III.1.2.3. Taux de positivité des cultures :

Après mise en culture, 43 (41 %) prélèvements se sont avérés négatifs et le reste étant positifs (59 %). (Figure N°09)

Parmi ces derniers, 42 cultures (67,74%) sont monomicrobiennes, les 20 cultures restantes (32,26%) sont polymicrobiennes. (Figure N°10)

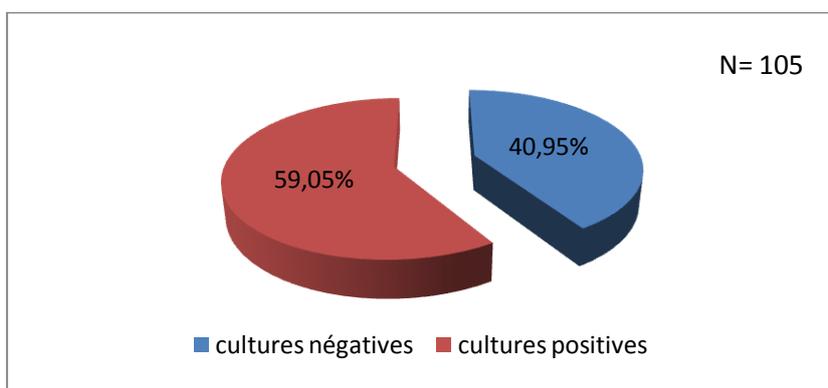


Figure N°09 : Taux de positivité des prélèvements de pus auriculaires reçus.

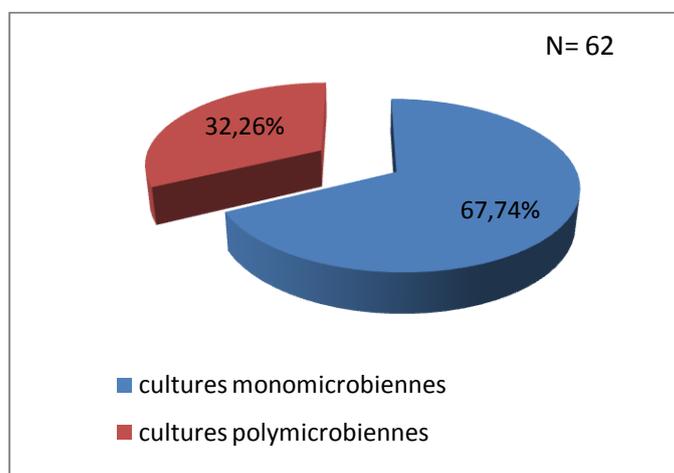


Figure N°10 : Taux de cultures monomicrobiennes et polymicrobiennes.

III.1.2.4. Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram :

Le nombre total de bactéries isolées est de 83 et sont issues de cultures mono ou polymicrobiennes.

On distingue les bactéries à Gram négatif qui sont au nombre de 56 (67 %), et des bactéries à Gram positif au nombre de 27 (33 %). (Figure N°11)

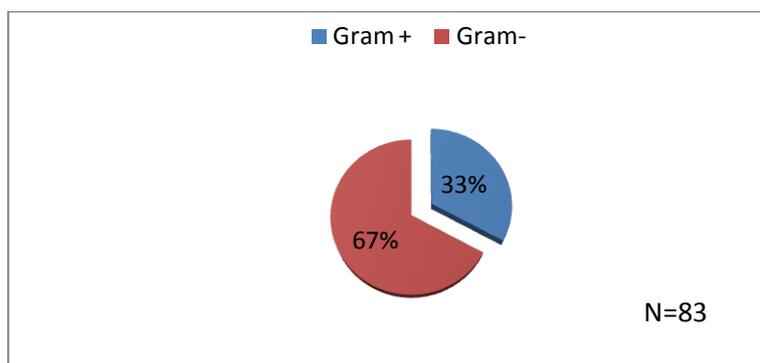


Figure N°11 : Répartition des bactéries isolées selon la coloration de Gram.

III.1.2.5. Répartition des bactéries incriminées selon le genre bactérien :

Les genres bactériens isolés sont représentés majoritairement par *Pseudomonas* (27,71%) suivi par le genre *Staphylococcus* (20,48%), ainsi que *Proteus* (13,25%) et *Streptococcus*(10,84%). (Figure N°12)

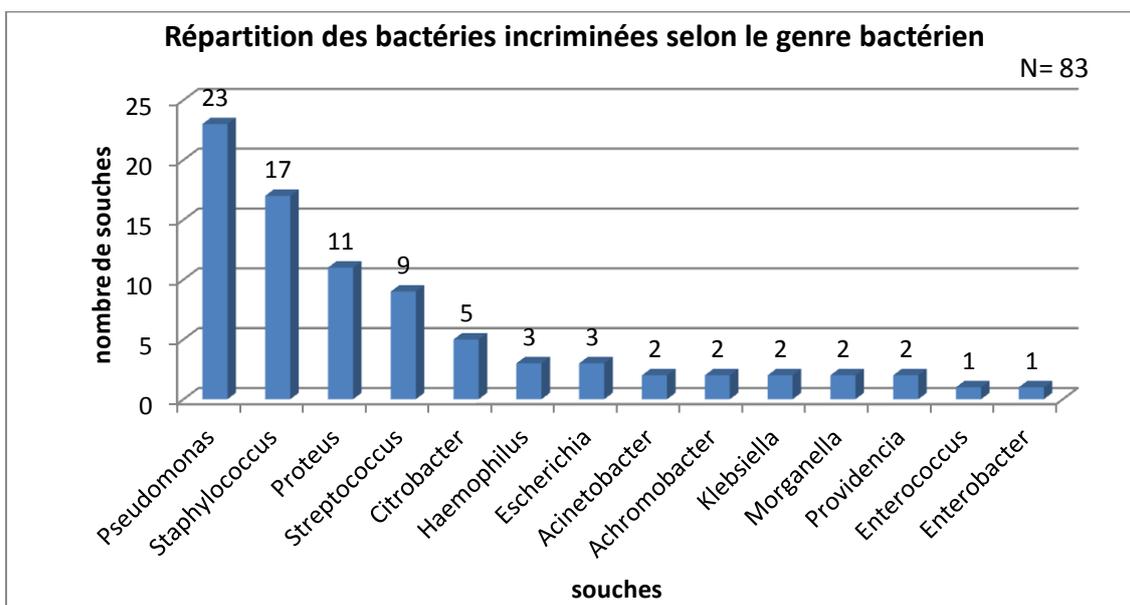


Figure N°12 : Répartition des bactéries incriminées selon le genre bactérien.

III.1.2.6. Répartition selon les espèces bactériennes isolées :

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est la plus dominante avec 19 souches isolées (22,89%), alors que *Staphylococcus aureus* vient en deuxième position avec 17 souches (20,48 %), suivie par *Proteus sp.* qui compte 6 souches (7,22 %). (Figure N°13)

Les espèces *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* responsables des otites moyennes aiguës, sont présentes respectivement avec un nombre de souche de 3 chacune (3,61 %).

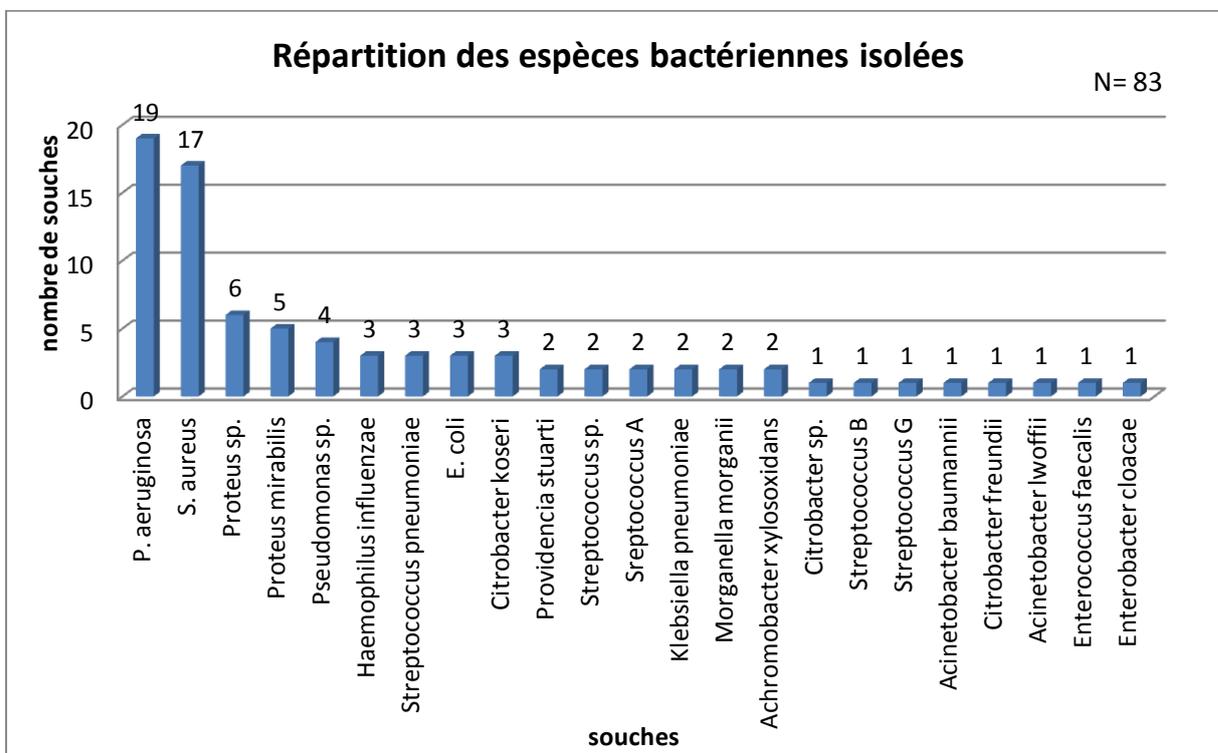


Figure N° 13 : Répartition des espèces bactériennes isolées.

III.1.2.7. Antibiorésistances des principales bactéries mises en causes :

a) *Pseudomonas* et antibiorésistances :

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Pseudomonas* isolées a montré certaines résistances vis-à-vis des molécules testées. Les résistances sont répertoriées dans le tableau N° IX.

Tableau IX: Fréquence de résistance de *Pseudomonas* vis-à-vis des antibiotiques testés.

Antibiotiques testés	Nombre de souches résistantes de <i>Pseudomonas</i> / nombre total des souches
FOS ₅₀	18 souches résistantes sur 23 souches totales
ATM	2/23
CAZ	3/23
TM	1/23
IPM	3/23
TIC	2/23
PIP	3/23
AN	1/23

Les 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème présentent le profil de résistance répertorié dans le tableau suivant :

Tableau X : Profil de résistance des 3 souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Résistant	Sensible
Souche 1	FOS, PIP, CAZ, TIC, IPM	AN, TM, ATM
Souche 2	FOS, CAZ, TIC, PIP, IPM	TM, GM, AN, ATM
Souche 3	FOS, CAZ, TEC, PIP, IPM	ATM, GM, TM, AN

b) *Staphylococcus aureus* et antibiorésistances :

Les résistances aux antibiotiques des souches isolées de *Staphylococcus aureus* sont résumées dans le tableau XI.

Tableau XI : Fréquence de résistance de *S. aureus* vis-à-vis des antibiotiques testés.

Antibiotiques testés	Nombre de résistances de <i>S. aureus</i> / nombre total des souches
FOX	1/17
OX ₁	1/17
P	16/17
E	3/17
CM	2/17
K	7/17
AN	7/17
OFX	1/17
FA	3/17
FOS	2/17

Il est à mentionner qu'il y a parmi ces Staphylocoques une souche de *Staphylococcus aureus* MRSA +, qui est résistante à l'ensemble des bêta lactamines et qui présente par ailleurs des résistances associées aux molécules suivantes : E, K, AN, CM, OFX, FOS.

c) Entérobactéries et antibiorésistances :

Le nombre total des entérobactéries isolées est de 26 souches représentées essentiellement par le genre *Proteus* (42,30%).

L'étude de la résistance aux antibiotiques des différentes souches est répertoriée dans le tableau ci-dessous :

Tableau XII : Etude de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques.

Antibiotiques testés	Nombre de résistances des entérobactéries/nombre total des souches
AM	20/26
CTX	1/26
AMC	11/26
CZ	21/26
SXT	5/26
FOS	1/26

La recherche de la BLSE chez les entérobactéries a été effectuée chez différentes souches : il existe une seule souche *Klebsiella pneumoniae* qui a présenté le phénotype BLSE. Il s'agit d'une *K. pneumoniae* BLSE+, qui a développé une résistance aux différents antibiotiques : AM, CZ, AMC, CTX, AN.

d) *Haemophilus influenzae* et antibiorésistances :

Durant cette étude, 3 souches d'*Haemophilus influenzae* ont été isolées. L'étude de l'antibiorésistance est rapportée dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Antibiorésistance des souches d'*Haemophilus influenzae* isolées.

Souches d' <i>Haemophilus influenzae</i> isolées	Antibiorésistances
Souche n° 1	Aucune résistance
Souche n° 2	SXT
Souche n° 3	Aucune résistance

e) *Streptococcus pneumoniae* et résistances aux antibiotiques :

3 souches ont été également isolées. La résistance de ces souches est résumée dans le tableau XIV.

Tableau XIV : Résistance des souches de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques.

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Résistance aux ATB
Souche 1	AMX
Souche 2	OX ₁ / FOS ₅₀ / E / CM / SXT
Souche 3	OX ₁ / FOS ₅₀ / E / CM

Deux tiers des souches isolées de *S. pneumoniae* sont résistantes à ces molécules : Oxacilline, Fosfomycine, Erythromycine, Clindamycine.

III.2. Discussion :

En comparant les résultats de l'étude rétrospective à ceux de notre étude, on remarque une augmentation du nombre de cas positifs des malades consultant à titre externe par rapport à ceux des malades hospitalisés. Ceci est dû probablement à l'augmentation du nombre des consultants et la présence d'un service spécialisé en ORL qui fait des consultations pour les malades externes, ainsi que des prélèvements qui seront transférés au laboratoire ensuite.

La majorité des prélèvements (99%) ont été effectués par écouvillonnage. Des études réalisées par **Klossek (2000)** sur 179 prélèvements de pus auriculaires, montrent que la plupart des prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage (97%). Ce qui montre une concordance avec le taux de prélèvements par écouvillonnage qu'on a réceptionné.

Le taux de positivité des prélèvements de pus auriculaires après mise en culture est de 59% avec une prédominance de cultures monomicrobienne (67,74%). Ces résultats concordent avec ceux de **Klossek (2000)**, qui indique que la majorité de ses prélèvements étaient monomicrobiens.

Les genres bactériens isolés sont représentés essentiellement par *Pseudomonas* et *Staphylococcus* suivis de *Proteus*. Ces résultats sont comparables à ceux de l'étude rétrospective, où on a pu observer une prédominance des deux premiers genres respectivement durant les trois années. En 3^{ème} position se trouve le genre *Haemophilus* en 2010, et *Proteus* en 2011 et 2012. Nos résultats sont proches de ceux de l'étude rétrospective.

Les espèces prédominantes sont *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, suivis par *Proteus sp.* et *Proteus mirabilis*.

Selon les travaux de **Klossek (2000)**, l'espèce la plus souvent isolée est *Pseudomonas aeruginosa* au cours des cas d'otites externes. Il affirme que la prédominance de *P. aeruginosa* se traduit probablement plus souvent par une contamination que par une pathologie due à ce germe.

Les otites externes bactériennes représentent environ 90% des cas, causées par la prolifération des germes commensaux, tels que *P. aeruginosa* (60% des cas) et *S.*

aureus (30% des cas). Les autres bactéries: *E. coli*, *Proteus* sont plus rarement détectées (**Bizindavyi et al., 2007**).

Pseudomonas aeruginosa est le principal agent responsable des otites externes simples, souvent acquises à l'issue d'un bain et connu sous le nom d'otites du nageur. Au cours des otites externes chroniques et des otites moyennes chroniques, *P. aeruginosa* est également la bactérie la plus souvent isolée devant *S. aureus* (**Mérens et al., 2013**).

Lors d'une otite externe, l'otorrhée contient deux germes principaux : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Ce sont des saprophytes occasionnels de la peau du conduit auditif externe (**François, 2002**).

De plus, une étude réalisée à Alger sur les otites moyennes chroniques, montre que les bacilles à Gram négatif font partie des 60% des cas positifs (**Ammari et al., 2001**).

Les antibiotiques habituellement actifs sur *Pseudomonas aeruginosa* appartiennent à plusieurs familles, mais possède une résistance naturelle à plusieurs antibiotiques (**Mérens et al., 2013**).

Habituellement, *Pseudomonas aeruginosa* est sensible à la fosfomycine. Nos résultats montrent que 18 souches testées sont résistantes à cet antibiotique. Cependant, le reste des molécules testées ont de faibles proportions de résistance.

Staphylococcus aureus est résistant presque à 100 % à la pénicilline G et sensible à la pénicilline M (oxacilline). (**Ammari et al., 2001**).

La sécrétion de pénicillinases est présente chez 70 à 90 % des *Staphylococcus aureus*. La résistance à l'oxacilline (ou résistance à la méticilline) traduit la présence d'une cible des bêtalactamines nouvelle et insensible à ces antibiotiques, la protéine de liaison aux pénicillines PLP2a, codée par le gène *mecA*. La résistance à la méticilline est croisée vis-à-vis des autres bêta-lactamines (**Leclercq, 2002**).

Les entérobactéries ont un taux élevé de résistance acquise à la pénicilline A. Le cotrimoxazole, les céphalosporines de 1ère ou de 2ème génération et l'Augmentin sont les molécules antibiotiques les plus actives (**Ammari et al., 2001**).

Le mécanisme essentiel de résistance de *Haemophilus influenzae* aux antibiotiques est une sécrétion de bêtalactamases. De 30 à 40 % des souches isolées d'otite moyenne aigue présentent ce mécanisme de résistance, rendant l'amoxicilline et, à un moindre degré, les céphalosporines de première génération inactives (Nicollas et al., 2004).

En Algérie, une enquête menée au CHU de Béni-Messous montre que 25 % des souches d'*H. influenzae* isolées de la sphère ORL sont sécrétrices de bêtalactamase alors que la résistance au cotrimoxazole est inférieure à 10% (Ammari et al., 2001).

La résistance aux antibiotiques des souches de pneumocoque isolées d'otite moyenne aiguë est en augmentation. 70 % des souches isolées d'otites moyennes aigues (en situation d'échec) avaient une sensibilité diminuée aux bêtalactamines (par modification des protéines de liaison aux pénicillines) et plus de la moitié d'entre elles étaient résistantes (CMI pour la pénicilline > 1 mg/l) (Nicollas et al., 2004).

Une étude faite en Algérie, montre que 35% des pneumocoques isolés de la sphère ORL chez l'enfant sont résistants à la pénicilline, dont la majorité sont résistants intermédiaires. Cette résistance est souvent associée à la résistance aux tétracyclines, aux macrolides (anciens et nouveaux) et au cotrimoxazole, limitant ainsi les alternatives thérapeutiques (Ammari et al., 2001).

Conclusion

Cette étude a révélé un taux de cas positifs élevé avec une prédominance des infections de l'oreille dues à *Pseudomonas aeruginosa* (22,89%) et *Staphylococcus aureus* (20,48%); dont le premier est un germe de l'environnement ; et l'autre, un principal commensal de la peau. Cependant, leur présence n'exclue d'autres germes comme les entérobactéries, qui sont également impliqués dans ce type d'infection, mais à des fréquences relativement faibles.

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques des principales bactéries incriminées a montré l'existence de certaines résistances acquise aux molécules utilisées en plus des résistances naturelles.

La plupart des souches isolées de *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles à la majorité des antibiotiques utilisés à l'exception de la fosfomycine (18 souches résistantes).

Une fiche technique a été réalisée à partir des différentes étapes de l'analyse bactériologique pour but de guider et faciliter le diagnostic aux laborantins.

La prévention reste un point important et efficace contre ce type d'infection, et quelques recommandations peuvent être établies :

- Éviter les grattages fréquents lors de l'utilisation de cotons-tiges, lors d'un lavage brutal de l'oreille, ou avec l'utilisation de produits irritants.
- Après un bain, il faudra sécher les oreilles, car la stagnation de l'eau ou la transpiration du conduit auditif externe font macérer la peau et élever son pH, qui est normalement acide. Ceci modifie la flore bactérienne en permettant la prolifération de germes pathogènes.
- L'utilisation intensive d'antibiotiques peut provoquer des résistances bactériennes, donc il est préférable de faire des analyses bactériologiques et prendre ensuite l'antibiotique prescrit par le médecin.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ **Ammari H., Ramdani-Bouguessa N., Bellouni R., 2001** : Antibiothérapie dans les infections ORL, Médecine du Magreb n°91.
- ❖ **Aveline L., Bouccara D., Chauvet J., Crusson J.-C, Dagnet D., Daoud Y., Depondt J., Dimino J., Huynh H., Mallay D., Masson-Mosca M.-A., Immergout-Maufoux R., Levacher M.-O., Marioton S., Mauger B., Moreau C., Sorin R., Nehari A., 2001** : Oto-rhino-laryngologie, D.E infirmier, édition ESTEM, ISBN : 2843711169 : p.13.
- ❖ **Avril J.-L., Dabernat H., Denis F., Monteil H., 1992** : Bactériologie clinique 2^{ème} édition, édition Ellipses : p.09.
- ❖ **Ayache D., Bonfils P., 2001** : O.R.L édition 2002-2003, ISBN : 2-84371-134-7 éditions ESTEM : p.109.
- ❖ **Barry B., 2005** : Facteurs infectieux et non infectieux des otites et des sinusites, Antibiotiques, Elsevier Masson, p. 219-223.
- ❖ **Bizindavyi F., Guyot J.-P., Kos M.-I., 2007**: Otites externes : une maladie auto-infligée ?, Revue médicale Suisse N°127 publiée le 03/10/2007.
- ❖ **Bokowy C., Cadot M., Lelièvre G., 1995** : Pathologie acquise de l'oreille externe, EMC- Oto-rhino-laryngologie, Elsevier Masson.
- ❖ **Brisou P., Chamouilli J.-M., Gaillard T., Muzellec Y., 2004** : Infections à pneumocoques, EMC- Pédiatrie [Article 4-260-B-10], Elsevier Masson.
- ❖ **Dabernat H., 2004** : *Haemophilus influenzae*, EMC- Biologie médicale [Article 90-05-0175], Elsevier Masson.
- ❖ **De La Blanchardière A., Dargère S., Verdon R., 2009** : Infections à Acinetobacter, Moraxella, Kingella et Eikenella, EMC- Maladies infectieuses [Article 8-017-F-20], Elsevier Masson.
- ❖ **Denis F., Ploy M.-C., Martin C., Bingen E., Quentin R., 2007**: Bactériologie médicale : techniques usuelles, Elsevier Masson, ISBN : 978-2-294-01172-6 : p. 165.

- ❖ **Dubreuil C., 2001** : Inflammation et otite moyenne aiguë, La presse médicale n°39-40, Elsevier Masson, p. 22-29.
- ❖ **Fauchère J.-L., Avril J.-L., 2002** : Bactériologie générale et médicale, édition Ellipses, ISBN : 2-7298-0747-0.
- ❖ **François M., 2002** : Otorrhée et aérateurs transtympaniques, Journal de Pédiatrie et de puériculture n°05, Elsevier Masson.
- ❖ **François M., 2005** : Complications des otites moyennes aiguës et chroniques, EMC – Oto-rhino-laryngologie [Article 20-135-A-10] Elsevier Masson.
- ❖ **Frenay J., Girardo P., Freydière A.-M., Renaud F., 2006**: Entérobactéries, EMC-Biologie médicale [Article 90-05-0135], Elsevier Masson.
- ❖ **Goubau P., Van Gompel A., 2000** : Repères en Microbiologie 3^e édition, Garant, ISBN : 90-441-1002-0.
- ❖ **Grosjean J., Clavé D., Archambaud M., Pasquier C., 2009** : Bactériologie et virologie pratique, 1^{ère} édition, De Boeck, ISBN : 978-2-8041-0491-7.
- ❖ **Hallouët P., 2010** : Mémo-guide infirmier : sciences biologiques et médicales, 2^e édition Masson : p. 118.
- ❖ **Hervé N., Lorient M., 2008** : 100 conseils de comptoir 4^e édition, édition Porphyre.
- ❖ **Joly R., Reynaud A., 2003** : Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic, ISBN : 2-7430-0582-3, édition Lavoisier : p. 19.
- ❖ **Kayser F.H., Bottger E.C., Zinkernagel R.M., Haller O., Eckert J., Deplazes P., 2008** : Manuel de poche de Microbiologie médicale, édition Flammarion Médecine-Sciences, ISBN : 978-2-2571-1335-1.
- ❖ **Klossek J.M., 2000** : Epidémiologie et pratique des prélèvements microbiologiques en pathologie ORL ambulatoire, Médecine et maladies infectieuses, volume 30, supplément 2 : p. 114-117.
- ❖ **Lamontagne Y., 2010** : Encyclopédie familiale de la santé, créée par QA international, les éditions Québec Amérique inc, ISBN : 978-2-7644-0923-7, p. 214.
- ❖ **Leblanc A., 2004** : Système nerveux encéphalo-périphérique, vascularisation anatomie imagerie, ISBN : 3-540-21265-5, édition Brochée : p. 370.
- ❖ **Leclercq R., 2002** : Résistance des staphylocoques aux antibiotiques, Ann Fr Anesth Réanim, Elsevier Masson : 375-83.
- ❖ **Lescanne E., Lanotte P., Pondaven S., Autret-Leca E., 2006** : Otites moyennes aiguës, EMC – Oto-rhino-laryngologie [Article 20-085-A-10], Elsevier Masson : p.11.

- ❖ **Malard O., Beauvillain de Montreuil C., Legent F., 2005 :** Pathologie acquise de l'oreille externe, EMC – Oto-rhino-laryngologie [Article 20-070-A-10], Elsevier.
- ❖ **Marieb E.N. et Hoehn K.N., 2010 :** Anatomie et physiologie humaines : Adaptation de la 8^e édition Américaine : p.660, 662.
- ❖ **Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.-D., 2013 :** Infections *Pseudomonas aeruginosa*, EMC- Maladies infectieuses, Elsevier Masson : p. 1-18.
- ❖ **Meyer A., Deiana J., Bernard A., 2004:** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés, 2^e édition, Doin éditeurs ISBN : 2-7040-1170-2.
- ❖ **Michel-Briand Y., 2012 :** Aspects de la résistance bactérienne aux antibiotiques, édition L'Harmattan ISBN : 978-2-336-00546-1 : p. 12.
- ❖ **Molinier A., Massol J., Druot J., 2008 :** Pathologie médicale et pratique infirmière, tome3, Hématologie, cancérologie, neurologie, ORL, stomatologie, chirurgie maxillo-faciale, ophtalmologie, dermatologie, maladies infectieuses.
ISBN : 978-2-7578-0076-3.
- ❖ **Monteil H., 2006 :** Bacilles à Gram négatif non fermentants, EMC- Biologie médicale, [Article 90-05-0020], Elsevier Masson.
- ❖ **Moore K.L., Dalley A.F., 2001 :** Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques, traduction de la 4^e édition Américaine (université libre de Bruxelles) : p. 962, 967, 969, 971.
- ❖ **Nauciel C., Vildé J.-L., 2005 :** Bactériologie médicale 2^{ème} édition, Masson, ISBN : 2-294-01858-3.
- ❖ **Nguyen S., Bourouina R., 2008 :** Manuel d'anatomie et de physiologie, ISBN : 978-2-7573-0183-8 éditions Lamarre : p. 18.
- ❖ **Nicollas R., Sudre-Levillain I., Triglia J.-M., 2004 :** Otites moyennes aiguës de l'enfant, EMC- Médecine, Elsevier Masson : p. 433-439.
- ❖ **Philippon A., 2008 :** Résistance bactérienne : définitions, mécanismes, évolution. EMC- Maladies infectieuses, [Article 8-006-N-10], Elsevier Masson.
- ❖ **Portmann D., Herman D., Boudard P., 1997:** Pathologie infectieuse en oto-rhino-laryngologie, EMC - Maladies infectieuses [Article 8-003-M-10].
- ❖ **Quevauvilliers J., 2009 :** Dictionnaire médical avec atlas anatomique, 6^e édition, Masson, ISBN : 978-2-294-01172-6 : p. 893.

- ❖ **Rahal K., Benslimani A., Tali-Maamar H., Missoum M.F.K., Kechih-Bounar S., Ammari H., 2011** : Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (Médecine humaine et vétérinaire) édité avec la collaboration de l'OMS.
- ❖ **REMIC, 2010** : Référentiel en microbiologie médicale, 4^e édition par le groupe Rémic de la société Française de Microbiologie.
- ❖ **Ricard F., 2010** : Traité de médecine ostéopathique du crâne et de l'articulation temporomandibulaire, ISBN : 978-2-8101-0123-8, Elsevier Masson.
- ❖ **Runge M.S., Greganti A.M., 2011**: Médecine interne de Netter traduit par Elsevier Masson, ISBN : 978-2294709517 : p. 81.
- ❖ **Schaechter M., Medoff G., Eisenstein B.I., 1999**: Microbiologie et pathologie infectieuse traduction de la 2^e édition Américaine, De Boeck : p. 13.
- ❖ **Singleton P., 2005** : Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies, Dunod, ISBN : 2-10-048873-2.
- ❖ **Souillard-Scemama R., Dubrulle F., 2006** : Pathologie inflammatoire et infectieuse de la sphère oto-rhino-laryngologique, EMC - Radiologie et imagerie médicale : Musculosquelettique – Neurologique – Maxillofaciale [Article 31-675-D-10] : 1-16 [Article 31-675-D-10].
- ❖ **Stora D., 2010** : Pharmacologie B.P classes pharmacologiques, 4^e édition : p 285.
- ❖ **Suddarth D.S., 2006** : Soins infirmiers en médecine et en chirurgie 4^e édition, De Boeck : p. 58.
- ❖ **Vandenesch F., Bes M., Etienne J., 2007** : Staphylocoques, EMC- Biologie médicale [Article 90-05-0255], Elsevier Masson.

ANNEXES

Annexe N°01

Tableau N°XV : Matériel non biologique.

verrerie et autres	<ul style="list-style-type: none"> - Tubes à essai - Pipettes Pasteur - Lames - Lamelles - Ecouvillons - Boite de Petri, - Milieux de culture: Mueller Hinton, gélose au sang cuit, gélose au sang frais, milieu Chapman, milieu Hecktoen, Bouillon BHIB. 		
Colorants, réactifs et autres	<p>Colorants :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bleu de méthylène - Violet de gentiane - Lugol - Fuschine 	<p>Réactifs :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Réactif de Kovacs - Réactif de Voges Proskauer (VP I, VP II) - Réactif de Griess (NR1, NR2) - Réactif de la TDA - Poudre de Zinc - Eau oxygénée 	<p>Autres :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Huile à immersion - Huile de vaseline - Eau physiologique stérile - Alcool - Disque d'oxydase - Disque d'optochine - Disque d'antibiotiques - Bandelettes E-test - Galeries API : API 20E, API 20 NE, API NH. - Milieux d'identification biochimique
Appareillage et autres	<ul style="list-style-type: none"> Microscope photonique Etuve bactériologique à 37°C Autoclave Réfrigérateur Bec bunsen Densitomètre Pince métallique Distributeur d'antibiotiques Jarre 		

Suite annexe N° 01

Gélose au sang frais

Principe et intérêt :

- Milieu riche qui permet la culture et l'isolement des bactéries exigeantes.
- La lecture de l'hémolyse est un critère d'orientation.
- Les levures cultivent aussi sur la gélose au sang frais.

Composition :

En grammes par litre d'eau distillée :

Mélange spécial de peptones.....	23
Amidon.....	1
NaCl.....	5
Agar.....	10
Sang	50 mL

pH final = 7,3

Gélose au sang cuit

Principe et intérêt :

- La cuisson du sang permet :
 - ✓ La libération de facteurs de croissance (facteur V « NAD⁺ » en particulier) à partir des protéines du sang dénaturées.
 - ✓ La destruction de certains inhibiteurs
- La gélose au sang cuit est donc un milieu très riche (apporte les facteurs X « hématies » et V qui permet la culture des bactéries très exigeantes en particulier Haemophilus.

Composition :

En grammes par litre d'eau distillée

Mélange spécial de peptones.....	23
Amidon.....	1

NaCl.....5
Agar.....10
Sang50 mL

pH final = 7,3

Technique :

Après avoir ajouté le sang à la base fondue, porter le mélange au bain marie à 75°C pendant 10 min ce qui provoque la destruction de certains facteurs de croissance dont on souhaite enrichir le milieu.

Milieu Chapman

Domaine d'utilisation :

La gélose de Chapman au mannitol permet l'isolement sélectif, la recherche et le dénombrement de staphylocoques.

Composition :

Pour un litre de milieu

- Tryptone.....5 g
- Peptone pepsique de viande.....1 g
- Extrait de viande.....1 g
- Mannitol.....10 g
- Chlorure de sodium75 g
- Rouge de phénol25 mg
- Agar agar bactériologique.....15 g

pH final = 7.4 ± 0.2 à 25°C

Principe :

- La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plus part des bactéries autres que les staphylocoques.

- La fermentation du mannitol, mise en évidence par virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic.

Gélose Hecktoen

La gélose Hektoen est un milieu sélectif des bacilles à gram négatif, d'aspect vert et translucide.

Composition :

Pour un litre du milieu :

- Peptone de viande.....12 g
- Extrait de levure.....3 g
- Sels biliaires.....9 g
- Chlorure de sodium.....5 g
- Thiosulfate de sodium.....5 g
- Citrate de fer ammoniacal.....1.5 g
- Lactose12 g
- Saccharose.....12 g
- Salicine.....2 g
- Bleu de bromothymol.....64 mg
- Fuschine acide0.40 mg
- Agar bactériologique.....13.5 g

Principe :

- Le principe de la lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine).
- Les microorganismes qui fermentent l'un d'entre eux forment des colonies de couleur saumon, les autres donnent des colonies bleues ou vertes.
- En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent avec le citrate ferrique des colonies à centre noir.

Gélose Mueller Hinton

Principe :

C'est un milieu solide (gélose riche), utilisé pour les tests standards de sensibilité aux antibiotiques des bactéries pathogènes.

Composition :

En gramme par litre d'eau purifiée

- Infusion de viande de bœuf.....300 g
- Hydrolysate de caséine.....17.5 g
- Amidon1.5 g
- Agar.....17 g
- Eau distillée.....1 L

pH final = 7.3 ± 0.2 à 25°C

Bouillon BHIB

Domaine d'utilisation :

Le bouillon cœur-cerveille, milieu nutritif tamponné, est utilisé pour la culture d'une très grande variété de microorganismes aérobies ou anaérobies, incluant levures et moisissures. Sa richesse en éléments nutritifs permet aux bactéries exigeantes d'atteindre rapidement la phase stationnaire de croissance.

Formule – type :

Pour 1 litre de milieu :

- Extrait cœur-cerveille17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine10,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Phosphate disodique2,5 g
- Glucose.....2,0 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.

Suite annexe N°01



Figure N°14 : Gélose au sang frais (Originale)

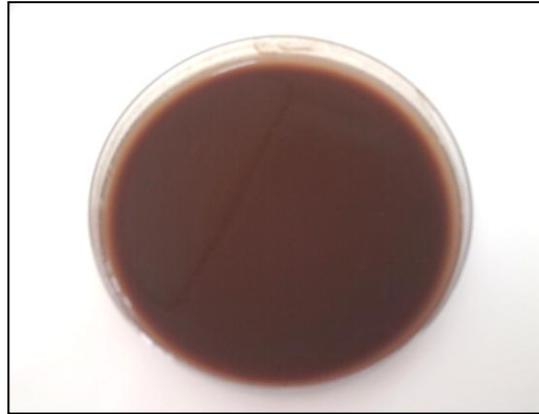


Figure N°15 : Gélose au sang cuit (Originale)

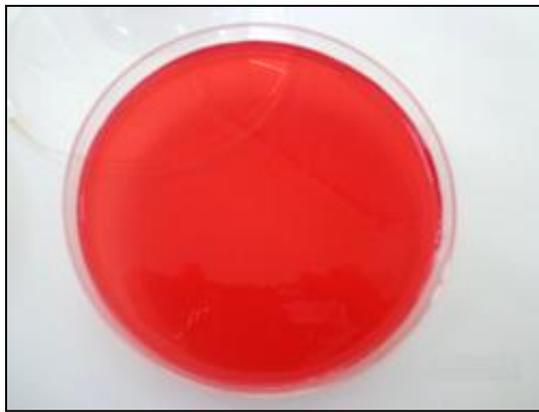


Figure N°16 : Milieu Chapman (Originale)



Figure N°17 : Milieu Hecktoen (Originale)



Figure N°18 : Milieu Mueller Hinton (Originale)

Suite annexe N° 01



Figure N°19 : Microscope optique (Originale)



Figure N°20 : Etuve (Originale)



Figure N°21 : Bec bunsen (Originale)



Figure N°22 : Densitomètre (Originale)



Figure N°23 : Jarre (Originale)



Figure N°24 : Distributeur d'antibiotiques (originale)

Suite annexe N°01



Figure N°25 : Bouillon BHIB (Originale)

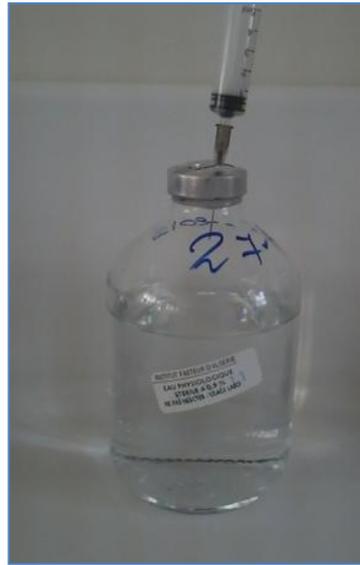


Figure N°26 : Eau physiologique stérile à 0,9% (Originale)



Figure N°27 : Disques d'antibiotique (Originale)



Figure N°28 : Bandelettes E-test (Originale)



Figure N°29 : Lamelles (Originale)



Figure N°30 : Ecouvillon (Originale)

Suite annexe N°01



Figure N°31 : disques d'oxydase
(Originale)



Figure N°32 : Bleu de
méthylène (Originale)



Figure N°33 : Violet de
gentiane (Originale)



Figure N°34: Lugol (Originale)



Figure N°35 : Alcool (Originale)



Figure N°36 : Fuschine
(Originale)



Figure N°37 : Milieu citrate de simmons



Figure N°38: milieu de conservation (originale)

Annexe N°02

Coloration de Gram

Technique :

- Réaliser un frottis et le fixer.
- plonger la lame dans le violet de gentiane pendant 1 minute. (a)
- laver la lame à l'eau distillée.
- plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute. (b)
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool. (c)
- Rincer immédiatement à l'eau distillée.
- plonger la lame dans la fuchsine phéniquée pendant 30 seconde à 1 minute. (d)
- laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier buvard (e).
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

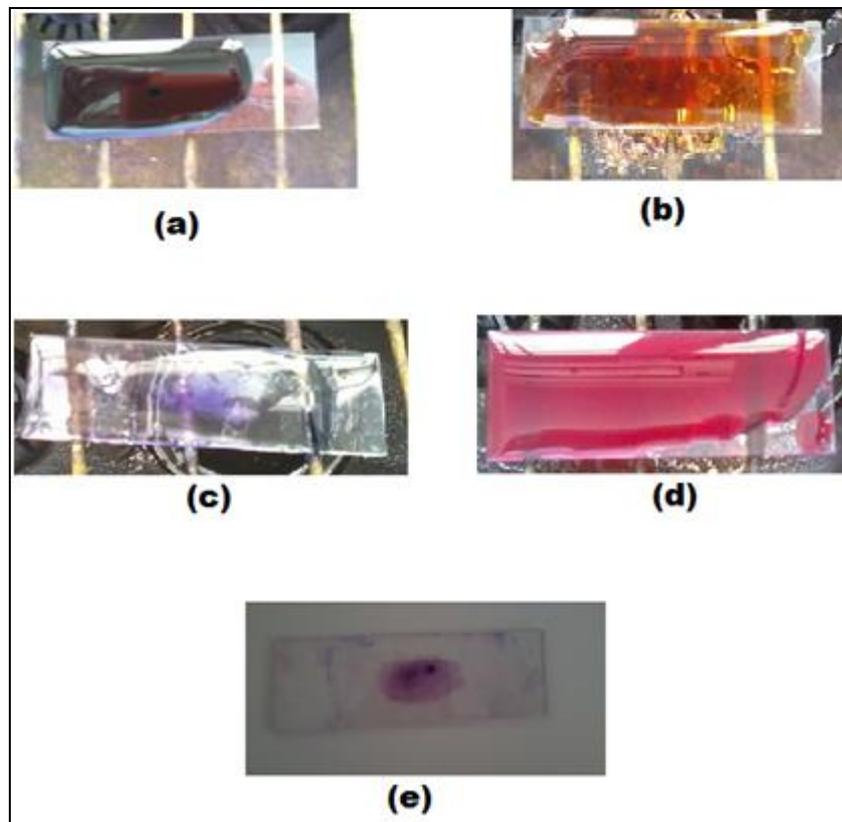


Figure N°39 : Etapes de la coloration de Gram. (Originale)

Annexe N°03

FICHE DE RENSEIGNEMENTS : ORL ET STOMATO

N° du prélèvement :

Date du prélèvement :/..... / 2013

Nom : Prénom :

Sexe : Masculin Féminin

Age :

Service :

Médecin traitant :

Origine :

Gorge

Narine

Mastoïde

Amygdale

Rhinopharynx

Larynx

intubation trachéal

Autres

Oreille externe

Oreille moyenne

Sinus maxillaire

Sinus sphénoïdal

Sinus frontal

Sinus ethmoïde

Renseignements cliniques :

Infection

Otite moyenne aiguë

Otite chronique

Sinusite aiguë

Sinusite chronique

Mucoviscidose

Autre

Greffe / Pré-greffe

immunodépression

Urgence chirurgicale

Examen demandé :

Bactéries banales

BK

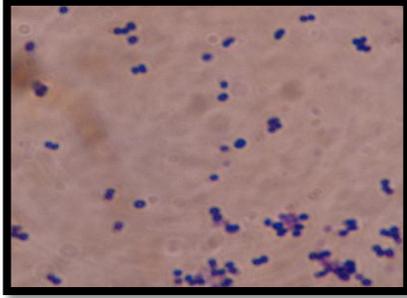
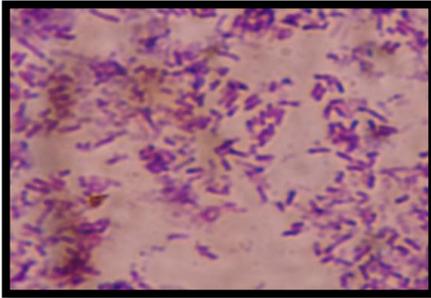
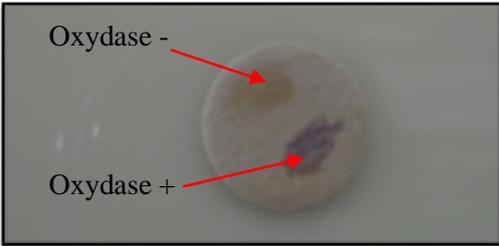
Anaérobies

Antibiothérapie :

Antibioprophylaxie :

Annexe N°05

Tableau XVI: Résultats de l'identification et l'étude de la sensibilité des bactéries incriminées.

Résultats obtenus		Photos
	Figure N°40 : Observation microscopique après coloration de Gram montrant des diplocoques à Gram positif.	
	Figure N°41 : Observation microscopique de bacilles à Gram négatif.	
	Figure N°42 : Test de la catalase positif.	
	Figure N°43 : Test de l'oxydase.	
	Figure N°44 : Agglutination aux particules de latex pour l'identification des streptocoques.	

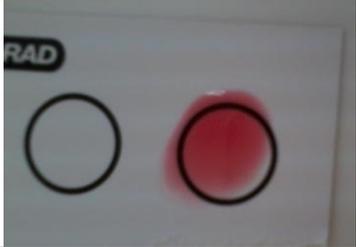
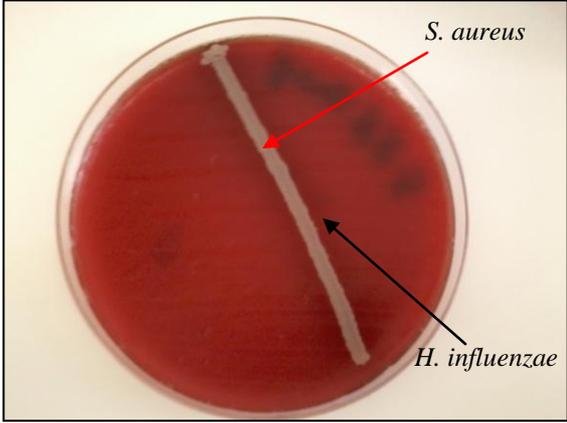
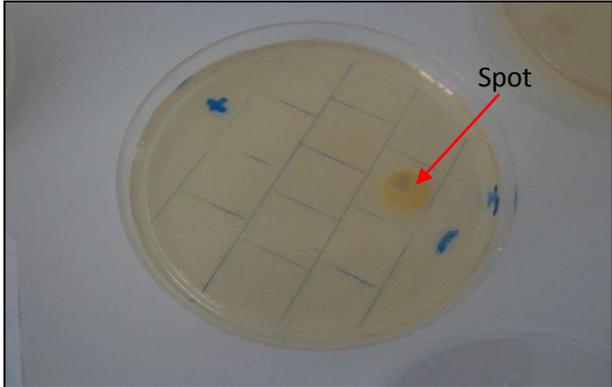
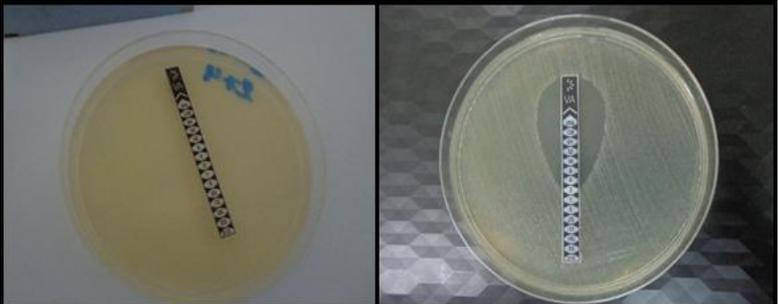
<p>Figure N°45 : Test d'agglutination des staphylocoques négatif.</p>	
<p>Figure N°46 : Test de satellitisme.</p>	
<p>Figure N°47 : Détermination de la CMI par technique de dilution en gélose.</p>	
<p>Figure N°48 : Détermination de la CMI par la technique E-test.</p>	

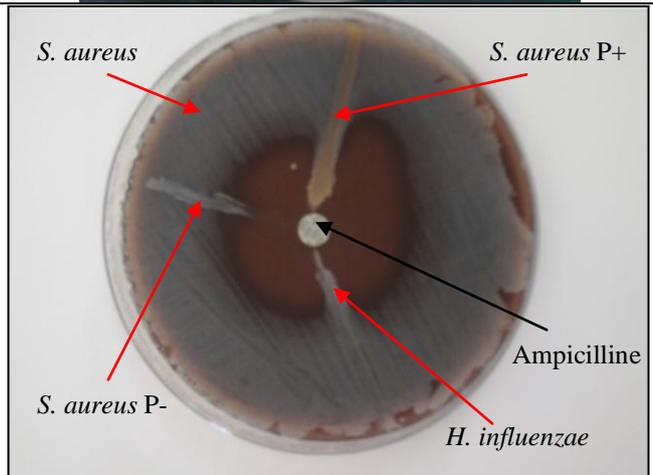
Figure N°49:
Test de synergie négatif.



Figure N°50 :
Technique du double disque.



Figure N°51 :
Test de trèfle négatif.



Annexe N°06

Tableau XVII : Technique d'antibiogramme (diffusion de disques antibiotiques)
(RAHAL et al., 2011).

Microorganismes	Milieu pour antibiogramme	Inoculum microbien	Conditions d'incubation
Entérobactéries <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Staphylococcus spp.</i> <i>Enterococcus spp.</i> <i>Vibrio cholerae</i> - <i>Vibrio spp.</i> <i>Aeromonas spp.</i> - <i>Plesiomonas spp.</i> Autres bactéries non exigeantes	Gélose Mueller-Hinton	0,5 MF en eau physiologique (diluer au 1/10ème pour les charges CA-SFM)	18 heures (à prolonger pour OXA et VAN/TEC) 35°C Atmosphère ordinaire
<i>Streptococcus spp.</i>	Gélose Mueller-Hinton + 5% sang de mouton	0,5 MF en eau physiologique	20-24 heures 35°C 5% CO ₂
<i>Pasteurella spp.</i>			18-24 heures 35°C Atmosphère Ordinaire
<i>Campylobacter jejuni/coli</i> (selon SFM)		0,5 MF en eau physiologique à diluer au 1/10ème	18 à 24 heures 35°C-37°C Microaérophilie
<i>Haemophilus spp.</i>	Gélose Heamophilus Test Medium		16 – 18 heures 35°C 5% CO ₂

Annexe N°07 :

Tableau XVIII : Tableau de lecture de la galerie API 20E.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1,9	Lysine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1,9	Ornithine DéCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0,756	utilisation du CITrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0,075	production d'H ₂ S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	<u>TDA / immédiat</u>	
				jaune	marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	<u>JAMES / immédiat</u>	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1,9	production d'acétoïne (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				incoloré / rose pâle	rose / rouge (5)
<u>GEL</u>	gélatine (origine bovine)	0,6	Gélatinase (GELatine)	non diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	1,9	fermentation / oxydation (GLUcose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune / jaune gris
MAN	D-mannitol	1,9	fermentation / oxydation (MANnitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
INO	inositol	1,9	fermentation / oxydation (INOsitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentation / oxydation (SORbitol) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
RHA	L-rhamnose	1,9	fermentation / oxydation (RHAMnose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
SAC	D-saccharose	1,9	fermentation / oxydation (SACcharose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
MEL	D-melibiose	1,9	fermentation / oxydation (MELibiose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
AMY	amygdaline	0,57	fermentation / oxydation (AMYgdaline) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
ARA	L-arabinose	1,9	fermentation / oxydation (ARAbinose) (4)	bleu / bleu-vert	jaune
OX	(voir notice du test oxydase)		cytochrome-OXYdase	(voir notice du test oxydase)	

Suite annexe N°07 :

Tableau XIX : Tableau de lecture de la galerie API 20 NE.

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat incolore vert pâle / jaune rose	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD- galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe N°08 :

Tableau XX: Préparation des dilutions d'antibiotique (RAHAL et al., 2011).

Etape	Concentration (µg/ml)	ATB (ml)	Diluant (ml)	Concentration intermédiaire	Concentration finale dans la gélose (µg/ml)
Solution mère	5120			5210	512
1	5120	2	2	2560	256
2	5120	1	3	1280	128
3	5120	1	7	640	64
4	640	2	2	320	32
5	640	1	3	160	16
6	640	1	7	80	8
7	80	2	2	40	4
8	80	1	3	20	2
9	80	1	7	10	1
10	10	2	2	5	0,5
11	10	1	3	2,5	0,25
12	10	1	7	1,25	0,125

Tableau XXI: Liste des abréviations des antibiotiques (RAHAL et al., 2011).

Familles	Antibiotiques	Abréviations
β-LACTAMINES	Pénicilline	P
	Oxacilline	OX
	Ampicilline	AM
	Amoxicilline + Ac.clavulanique	AMC
	Ticarcilline	TIC
	Ticarcilline + Ac.clavulanique	TCC
	Pipéracilline	PIP
	Céfazoline	CZ
	Céfoxitine	FOX
	Céfotaxime	CTX
	Céftazidime	CAZ
	Aztréonam	ATM
	Imipénème	IPM
Céfépime	FEP	
AMINOSODES	Kanamycine	K
	Amikacine	AN
	Tobramycine	TM
MACROLIDES	Erythromycine	E
	Clindamycine	CM
GLYCOPEPTIDES	Teicoplanine	TEC
SULFAMIDES ET ASSOCIES	Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	SXT
QUINOLONES	Ofloxacine	OFX
AUTRES	Acide fusidique	FA
	Fosfomycine	FOS

Annexe N°09 :

Tableau XXII : Fréquences des bactéries isolées en 2010.

Bactéries isolées	Nombre de souches	Fréquences
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	21,56%
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	17,64%
<i>Haemophilus sp.</i>	7	13,72%
<i>Enterobacter sp.</i>	5	9,80%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	9,80%
<i>Proteus mirabilis</i>	3	5,88%
<i>Proteus vulgaris</i>	3	5,88%
<i>Citrobacter sp.</i>	2	3,92%
<i>Eschrichia coli</i>	2	3,92%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	3,92%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,96%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	1,96%

Tableau XXIII : Fréquences des bactéries isolées en 2011.

Bactéries isolées	Nombre de souches	Fréquences
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	21,34%
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	20,22%
<i>Proteus mirabilis</i>	9	10,11%
<i>Haemophilus sp.</i>	6	6,74%
<i>Streptococcus sp.</i>	6	6,74%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4,49%
<i>Pseudomonas sp</i>	4	4,49%
<i>Eschrichia coli</i>	3	3,37%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3,37%
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2,24%
<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2,24%
<i>Providencia sp.</i>	2	2,24%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1,12%
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,12%
<i>Enterobacter sp.</i>	1	1,12%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,12%
<i>Klebsiella sp.</i>	1	1,12%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	1	1,12%
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	1,12%
<i>Providencia stuartii</i>	1	1,12%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	1,12%
Streptococcus β h�mo du grp A	1	1,12%
Streptococcus β h�mo du grp F	1	1,12%

Suite annexe N°09 :

Tableau XXIV : Fréquence des bactéries isolées en 2012.

Bactéries isolées	Nombre des souches	Fréquences
<i>Staphylococcus aureus</i>	36	22,5%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	20%
<i>Proteus mirabilis</i>	10	6,25%
<i>Eschrichia coli</i>	6	3,75%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	3,75%
<i>Steptococcus sp</i>	6	3,75%
<i>Haemophilus.influenzae</i>	5	3,12%
<i>Providencia stuartii</i>	5	3,12%
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	5	3,12%
<i>Haemophilus sp.</i>	4	2,40%
<i>Proteus sp.</i>	4	2,40%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	2,40%
<i>Citrobacter koseri</i>	3	1,87%
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	1,87%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	1,25%
<i>Enterobacter sp.</i>	2	1,25%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,25%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	1,25%
<i>Pseudomonas sp.</i>	2	1,25%
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2	1,25%
<i>Acinetobacter sp.</i>	1	0,62%
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	1	0,62%
<i>Bordetella hinzii</i>	1	0,62%
<i>Citrobacter braakii</i>	1	0,62%
<i>Enterococcus sp.</i>	1	0,62%
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	1	0,62%
<i>Klebsiella sp.</i>	1	0,62%
<i>Morganella morganii</i>	1	0,62%
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,62%
<i>Providencia sp.</i>	1	0,62%
<i>Providencia stutzeri</i>	1	0,62%
<i>Pseudomonas putida</i>	1	0,62%
<i>Salmonella sp.</i>	1	0,62%
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	0,62%
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,62%
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1	0,62%
Strepto β hémo du grp A	1	0,62%
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	0,62%
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	0,62%

Suite annexe N°09 :

Tableau XXV : Fréquences des bactéries isolées durant 5 mois (Février – Juin 2013).

Bactéries isolées	Nombre de souches	Fréquence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19	22,89 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	17	20,48 %
<i>Proteus sp.</i>	6	7,22 %
<i>Proteus mirabilis</i>	5	6,02 %
<i>Pseudomonas sp.</i>	4	4,81 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	3	3,61 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	3,61 %
<i>Escherichia coli</i>	3	3,61 %
<i>Citrobacter koseri</i>	3	3,61 %
<i>Providencia stuarti</i>	2	2,40 %
<i>Streptococcus sp.</i>	2	2,40 %
Sreptococcus du groupe A	2	2,40 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2,40 %
<i>Morganella morganii</i>	2	2,40 %
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	2	2,40 %
<i>Citrobacter sp.</i>	1	1,20 %
Streptococcus du groupe B	1	1,20 %
Streptococcus du groupe G	1	1,20 %
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	1,20 %
<i>Citrobacter freundii</i>	1	1,20 %
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	1,20 %
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,20 %
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,20 %

Annexe N° 10 :

Tableau XXVI : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour Entérobactéries (RAHAL et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ampicilline	10 µg	≤13	14-16	≥17	≥32	16	≤8
Amoxicilline + Ac. Clavulanique	20/10 µg	≤13	14-17	≥18	≥32/16	16/8	≤8/4
céfazoline	30 µg	≤19	20-22	≥23	≥8	4	≤2
Céfalotine	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Céfoxitine	30 µg	≤14	15-17	≥18	≥32	16	≤8
Céfotaxime	30 µg	≤22	23-25	≥26	≥4	2	≤1
Ceftriaxone	30 µg	≤19	20-22	≥23	≥4	2	≤1
Imipénème	10 µg	≤19	20-22	≥23	≥4	2	≤1
Ertapénème	10 µg	≤19	20-22	≥23	≥1	0.5	≤0.25
Amikacine	30 µg	≤14	15-16	≥17	≥64	32	≤16
Gentamicine	10 µg	≤12	13-14	≥15	≥16	8	≤4
Acide nalidixique	30 µg	≤13	14-18	≥19	≥32	---	≤16
Ciprofloxacine	5 µg	≤15	16-20	≥21	≥4	2	≤1
Chloramphénicol	30 µg	≤12	13-17	≥18	≥32	16	≤8
Colistine	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Furanes	300 µg	≤14	15-16	≥17	≥128	64	≤32
Fosfomycine	200 µg	≤12	13-15	≥16	≥256	128	≤64
Triméthoprim + sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	≤10	11-15	≥16	≥4/76	-----	≤2/38

Tableau XXVII : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa* (RAHAL et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ticarcilline	75 µg	14	---	15	128	---	64
Ticarcilline + Ac. Clavulanique	75/10 µg	14	---	15	128/2	---	64/2
Pipéracilline	100 µg	17	---	18	128	----	64
Céftazidime	30 µg	14	15-17	18	32	16	8
Aztréonam	30 µg	15	16-21	22	32	16	8
Imipénème	10 µg	13	14-15	16	16	8	4
Amikacine	30 µg	14	15-16	17	64	32	16
Gentamicine	10 µg	12	13-14	15	16	8	4
Nétilmicine	30 µg	12	13-14	15	32	16	8
Tobramycine	10 µg	12	13-14	15	16	8	4
Ciprofloxacine	5 µg	15	16-20	21	4	2	1
Levofloxacine	5 µg	13	14-16	17	8	4	2
Fosfomycine	50 µg	14	-----	14	32	---	32
Rifampicine	30 µg	14	14-18	19	16	16-8	4
Colistine	10 µg	10	-----	11	8	4	2

Tableau XXVIII : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacter spp.* (RAHAL et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Ticarcilline	75 µg	14	15 - 19	20	128	32-64	16
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	15 - 19	20	128/2	32/2-64/2	16/2
Pipéracilline	100 µg	17	18 - 20	21	128	32-64	16
Céftazidime	30 µg	14	15 - 17	18	32	16	8
Imipenème	10 µg	13	14 - 15	16	16	8	4
Amikacine	30 µg	14	15 - 16	17	64	32	16
Gentamicine	10 µg	12	13 - 14	15	16	8	4
Tobramycine	10 µg	12	13 - 14	15	16	8	4
Netilmicine	CMI	---	-----	-----	32	16	8
Ciprofloxacine	5µg	15	16 - 20	21	4	2	1
Levofloxacine	5µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Doxycycline	30µg	9	10 - 12	13	16	8	4
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 - 15	16	4/76	-----	2/38
Colistine	-----	-----	-----	-----	> 2		2
Rifampicine**	30µg	<14	14 - 18	≥19	> 16	16-8	≤ 4

Tableau XXIX : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Staphylococcus spp.* (RAHAL et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Pénicilline	10 UI	28	---	29	0,25	-----	0,12
Oxacilline (<i>S.aureus</i>)	1 µg	10	11 – 12	13	4	-----	2
Oxacilline (<i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	-----	-----	4	-----	2
Cefoxitine (<i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	21	---	22	8	-----	4
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	1 µg	----	---	-----	0,5	-----	0,25
Cefoxitine (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	30 µg	24	---	25	---	----	---
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4
Kanamycine	30 µg	13	14 – 17	18	64	32	16
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16
Erythromycine	15 µg	13	14 – 22	23	8	1-4	0.5
Clindamycine	2µg	14	15 – 20	21	4	1-2	0,5

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Vancomycine	CMI	---	---	-----	32	8-16	4
Telcoplanine	30 µg	10	11 – 13	14	32	16	8
Ofloxacine	5µg	14	15 – 17	18	4	2	1
Trimethoprime+sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 – 15	16	4/76	-----	2/38
Rifampicine	5µg	16	17 – 19	20	4	2	1
Tetracycline	30µg	14	15 – 18	19	16	8	4
Chloramphenicol	30µg	12	13 – 17	18	32	16	8
Pristinamycine	15 µg	< 19	19 – 21	≥ 22	> 2		≤ 1
Acide fusidique**	10 µg	< 24	-----	≥ 24	> 1		≤ 1
Fosfomycine**	50 µg	< 14	-----	≥ 14	> 32		≤ 32

Tableau XXX : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Streptococcus pneumoniae* (RAHAL et al., 2011).

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			Valeurs Critiques CMI (µg/ml)		
		R	I	S	R	I	S
Penicilline parenterale (non méningite)	---	---	---	---	≥ 8	4	≤ 2
Penicilline parenterale(Méningite)	---	---	---	---	≥ 0,12	-	≤ 0,06
Penicilline orale	---	---	---	---	≥ 2	0.12-1	≤ 0,06
Oxacilline	1 µg		----	≥ 20	---	---	---
Oxacilline**	5µg			≥ 26			
Amoxicilline	---	---	---	---	≥ 8	4	≤ 2
Cefotaxime (non méningite)	---	---	---	---	≥ 4	2	≤ 1
Cfotaxime (Méningite)	---	---	---	---	≥ 2	1	≤ 0,5
Imipénème	---	---	---	---	≥ 1	0,25 – 0,5	≤ 0,12
Vancomycine	30 µg	---	---	17	---	----	1
Erythromycine	15 µg	15	16 – 20	21	1	0,5	0,25
Clindamycine	2µg	15	16 – 18	19	1	0,5	0,25
Levofloxacine	5µg	13	14 – 16	17	8	4	2
Tétracycline	30µg	18	19 – 22	23	8	4	2
Chloramphénicol	30 µg	20	---	21	8	---	4
Rifampicine	5µg	16	17 – 18	19	4	2	1
Triméthoprime+sulfaméthoxazole	1,25/23,75µg	15	16 – 18	19	4/76	1/19-2/38	0,5/9,5
Pristinamicine**	15µg	<19	----	19	> 1	-----	≤ 1
Fosfomycine**	50µg	< 14	----	14	> 32	-----	≤ 32