

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

N° d'ordre :

N° de série :

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة غرداية

Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie et Sciences  
de la Terre



كلية علوم الطبيعة والحياة  
وعلوم الأرض

Département de Biologie

Université de Ghardaïa

قسم البيولوجيا

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de  
Master académique en Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie appliquée

Présenté par

KHERNEG Hamida

REMMA Khedidja

**THEME**

**Diagnostic des infections bactériennes provoquées**

*par **Brucella spp**, **Staphylococcus aureus***

*et **Escherichia coli***

Membres du jury

Grade

M. S. BELGHIT

MCB

Président

M.A. BAKELLI

MAA

Examineur 1

M. G. DIF

MAA

Examineur 2

M. N. BOURAS

Pr

Encadreur

Mai 2017



# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail:*

*A Le personne le plus chère à mon cœur : Papa qui m'a supporté vaillamment pas à pas tout au long de ma vie ..., Les mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour toi ; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très profondément et tu as été toujours un père idéale. Tu es le seule qui comprend ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.*

*A ma mère. A mes frères, A mes sœurs , pour l'amour , l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.*

*A mes très chères sœurs collègues de travail Farida ,Fatima, Fouzia , qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles.*

*Spéciale dédicace à Mebrouka, Samira, Marbouha, Ibtisam ,Fatima,abir et sara*

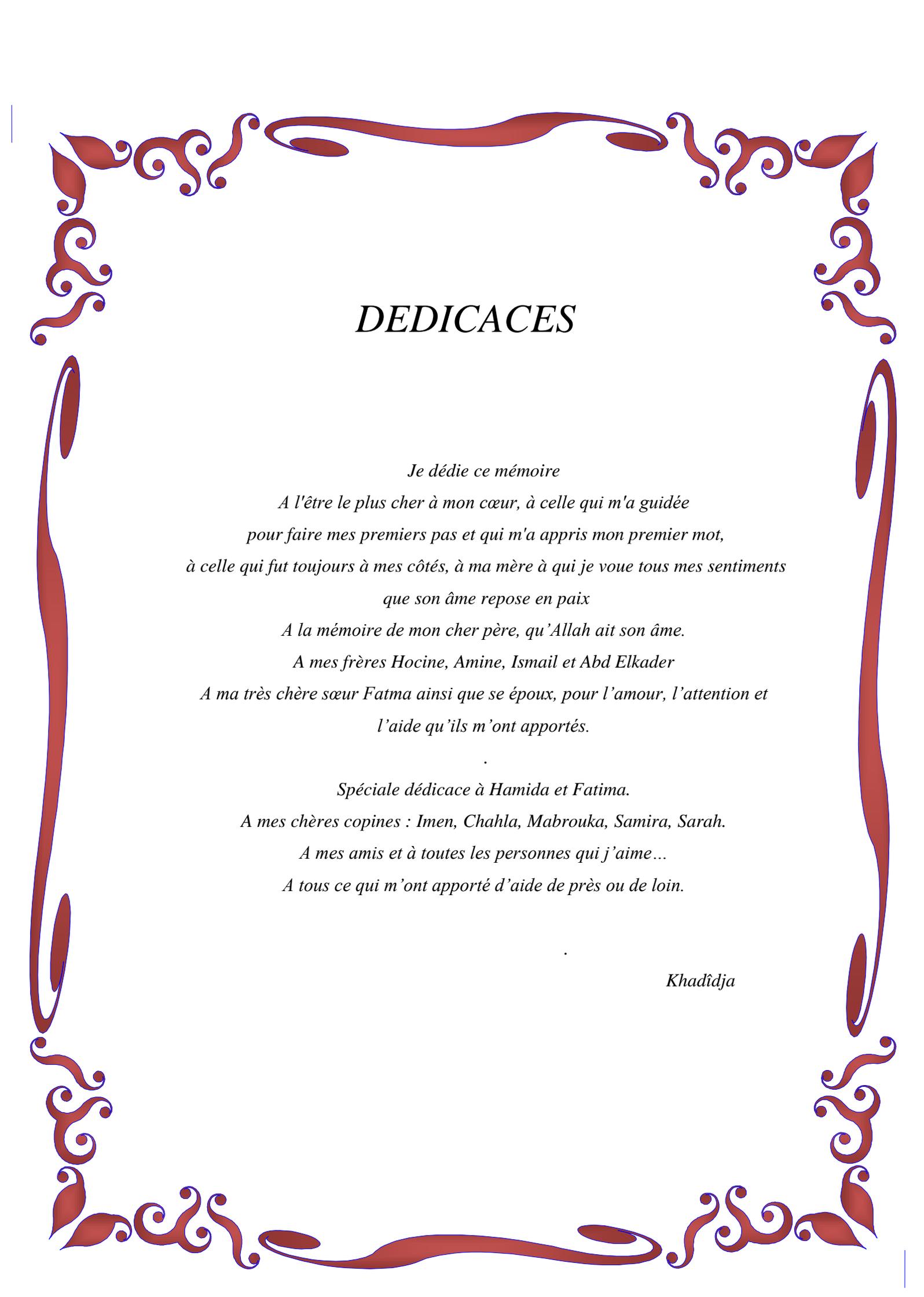
*A ma petite chères: Imene.*

*A ma copine khedidja*

*A mes amis et à toutes les personnes qui j'aime...*

*A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.*

*Hamida*



## *DEDICACES*

*Je dédie ce mémoire*

*A l'être le plus cher à mon cœur, à celle qui m'a guidée  
pour faire mes premiers pas et qui m'a appris mon premier mot,  
à celle qui fut toujours à mes côtés, à ma mère à qui je voue tous mes sentiments  
que son âme repose en paix*

*A la mémoire de mon cher père, qu'Allah ait son âme.*

*A mes frères Hocine, Amine, Ismail et Abd Elkader*

*A ma très chère sœur Fatma ainsi que se époux, pour l'amour, l'attention et  
l'aide qu'ils m'ont apportés.*

*Spéciale dédicace à Hamida et Fatima.*

*A mes chères copines : Imen, Chahla, Mabrouka, Samira, Sarah.*

*A mes amis et à toutes les personnes qui j'aime...*

*A tous ce qui m'ont apporté d'aide de près ou de loin.*

*Khadîdja*

# Remerciements

*Au terme de ce travail, il nous maitre agréable d'exprimer nous  
remerciements à tous ce qui ont contribué de près ou de loin à  
l'élaboration de ce mémoire.*

*nous tenions tout d'abord à remercier Mr Dr Bouras N., Professeur à la Faculté des  
sciences de la nature et de la vie, de l'université de Ghardaïa, pour son encadrement, ses précieux  
conseils, et les encouragements qui nous ont permis de réaliser ce travail, nous ne pouvons,  
monsieur, que sincèrement vous exprimer nous respect et nous gratitude.*

*Nous voudrions remercier aussi monsieur Belghit S. maitre de  
conférence B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Ghardaïa  
d'avoir accepté de nous faire l'honneur de présider ce jury.*

*Nous très vifs remerciements vont aussi à monsieur Bakelli A.,  
maitre assistant A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Ghardaïa, et  
Monsieur Dif G., maitre Assistante A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, contribuant  
par sa participation à l'examination de ce travail.*

*Nous ne saurons terminer sans remercier monsieur Ben Brahim de ces effort d'avoir ouvrir  
cette spécialité et surtout M elle Telli A. et Mm Hamid Oudjana A.: maitre de conférence A à la  
faculté des sciences de la nature et de la vie, de l'université de Ghardaïa et Mr Ben Semaoun Y;  
maitre de conférence A à la faculté des sciences de la nature et de la vie, et tous nous enseignant de  
université de Ghardaïa*

*Toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à notre travail est non  
négligeable notamment tout le personnel de laboratoire, de la EPH de Ghardaïa.*

## ***Liste des abréviations***

**AA** : Acide aminé.

**Ac**: Anticorps

**ADH** : arginine dihydrolase

**Ag**: Antigène.

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail

**API 20 E** : galeries miniaturisées

**APS** : l'assistant publique de la Santé

**B** : *Brucella*

**BHI** : *brain heart infusion* (milieu cœur cerveau)

**CIP** : collection de l'Institut Pasteur

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CRP** : C-reactivep rotein (protéine C-réactive)

**DSP** : Direction locale de la Santé et de la Population.

**EAT** : Epreuve de l'antigène tamponné

**ECBU** : Examen cyto bactériologique des urines

**EAggEC** : *E. coli* entéroagréatifs (*enteroaggregative E. coli*)

**ECEH ou EHEC** : *E. coli* entérohémorragiques

**ECEI ou EIEC** : *E. coli* entéro-invasifs

**ECEP ou EPEC** : *E. coli* entéro pathogènes

**ECET ou ETEC** : *E. coli* entérotoxinogènes

**ELISA**: Enzyme LikeImmunoSorbentAssay

***E. coli*** : *Escherichia coli*

**FC/CFT** : Complement Fixation Test

**GLU** : glucose

**GSC** : Gélose au sang cuit.

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène

**IF** : immunofluorescence

**IFD** : immunofluorescence directe

**IFI** : immunofluorescence indirecte

**IgG** : Immunoglobuline de type G

**IgM** : Immunoglobuline de type M

**IM**: Intramusculaire

**LAC** : lactose

**LCR** : *Liquide céphalo-rachidien*

**LDC** : lysine décarboxylase

**LPS** : Lipo Poly Saccharide

**M** : *Micrococcus*

**MH** : Mueller Hinton

**MO** : Moelle osseuse.

**ODC** : ornithine décarboxylase

**OMS** : organisation mondiale de la santé.

**ONPG** :Ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside

**PO** : Par voie orale

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PSM** : Poste de sécurité microbiologique

**PG** : peptidoglycane

**RB** : Rose Bengale

**RBT** : Rose Bengale Test

**RM** : Réaction rouge de méthyle.

**S** : *Staphylococcus*

**SAW** : séroagglutination de Wright

**SAT** : Séro-Agglutination Test

**SCN** : staphylocoques à coagulase négative

**SMAC** : Sorbitol MacConkey agar (milieu de MacConkey au sorbitol)

**TDA** : tryptophane désaminase

**TMB** : Tétraméthylbenzidine

**UI** : unité internationale

**VF** : gélose viande-foie

**VP** : Réaction de vogues-proskauer.

## *Listes des figures*

<b>Figure 1.</b> Carte géographique de la distribution mondiale de la brucellose.....	4
<b>Figure 2.</b> Milieu gélose chocolat.....	8
<b>Figure 3.</b> Milieu biphasique (Castaneda).....	8
<b>Figure 4.</b> Caractères biochimiques brucellique.....	9
<b>Figure 5.</b> Aspect de <i>S. aureus</i> en microscopie électronique (X 20000).....	13
<b>Figure 6.</b> Aspect du <i>E. coli</i> au microscope électrique 400 282 px.....	17
<b>Figure 7.</b> les étapes de réaliser test de rose Bengale.....	24
<b>Figure 8.</b> Agitateur de plaque .....	25
<b>Figure 9.</b> Galerie de test Saw avant incubation.....	26
<b>Figure 10.</b> Résultat de rose Bengale.....	30
<b>Figure 11.</b> Pourcentage des cas positif.....	31
<b>Figure 12.</b> Pourcentage des tests positifs selon sexe.....	31
<b>Figure 13.</b> Fréquence des prélèvements positifs d' <i>E. coli</i> et staphylocoque.....	35

## *Liste des photos*

<b>Photo 1.</b> Antigène brucellique.....	23
<b>Photo 2.</b> Antigène brucellique anti abortus.....	25
<b>Photo 3.</b> Prélèvements hémocultures .....	27
<b>Photo 4.</b> phénomène d'agglutination .....	30
<b>Photo 5.</b> Résultats positif de SAW.....	32
<b>Photo 6.</b> Aspect du staphylococcus sur Chapman.....	35
<b>Photo 7.</b> <i>E. coli</i> sur GN et BCP.....	36
<b>Photo 8.</b> Aspect d' <i>E. coli</i> sur Mac Conkey.....	36
<b>Photo 9.</b> Coloration de Gram sous microscope G ×100.....	37
<b>Photo 10.</b> Catalase positive.....	37
<b>Photo 11.</b> Mise en évidence absence d'oxydase.....	38
<b>Photo 12.</b> Test de coagulasse positif.....	38
<b>Photo 13.</b> Identification sur API E20.....	39
<b>Photo 14.</b> Antibiogramme D <i>E. coli</i> .....	40
<b>Photo 15.</b> Antibiogramme pour staphylococcus aureus.....	41

## *Liste des tableaux*

Tableau 1: Principales espèces de <i>Brucella</i> .....	6
Tableau 2: Intérêt des examens complémentaires de pratique courante au cours des différentes phases de la maladie.....	12
Tableau 3: Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose.....	13
Tableau 4: Caractères distinctifs de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
Tableau 5: Quelque caractère distinctif d' <i>E. coli</i> .....	17
Tableau 6 : Propriétés des <i>E. coli</i> responsables de diarrhées.....	19
Tableau 7: Durée d'incubation des flacons d'hémoculture .....	21
Tableau 8: Résultats du test RB.....	30
Tableau 9: Résultats positifs selon le sexe.....	31
Tableau 10: Résultats de sérodiagnostic de Wright durant la période Janvier à mars 2017.....	33
Tableau 11: Représentation des cas.....	34
Tableau 12: Résultat des tests biochimique d' <i>E. coli</i> .....	39
Tableau 13: La sensibilité d' <i>E. coli</i> aux ATB.....	40
Tableau 14: Résultats d'antibiogramme de staphylococcus aureus.....	41

## ***Table des matières***

Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1
<b>Synthèse bibliographique</b>	
1. Genre <i>Brucella</i> .....	3
1.1. Historique.....	3
1.2. Répartition géographique de la brucellose .....	3
1.3. Définition.....	5
1.4. Agent pathogène.....	5
a) Germe.....	5
b) Réservoirs.....	5
1.5. Transmission.....	6
1.6. Incubation .....	7
1.7. Signes cliniques.....	7
1.8. Diagnostic de la brucellose au laboratoire.....	8
1.8.1. Diagnostic bactériologique directe : isolement en culture.....	9
1.8.1.1. Caractères de culture .....	9
1.8.2. Diagnostic sérologique indirect.....	10
1.8.2.1. L'épreuve à l'antigène tamponné au Rose Bengale (EAT au RB).....	10
1.8.2.2. Sérodiagnostic de Wright en tubes (SAW) .....	10
1.8.2.3. Examens complémentaires.....	11
a) ELISA (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay) .....	11
b) Fluorescence Polarisation Assy.....	11
1.9. Traitement.....	12
1.9.1. Traitement curatif.....	12
1.9.2. Prophylaxie sanitaire.....	13
2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.1. Historique.....	14
2.2. Morphologie .....	14
2.3. Caractères cultureux .....	14
2.4. Caractères physiologiques et biochimiques .....	15

2.5. Pouvoir pathogène de <i>S. aureus</i> .....	16
3. <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.1. Historique.....	16
3.2. Morphologie.....	16
3.3. Caractères culturels et métaboliques.....	17
3.4. Diagnostic différentiel .....	17
3.5. pouvoir pathogène.....	18
a. Pouvoir pathogène pour l'homme.....	18
1. Infections extra-intestinales.....	18
2. Infections intestinales.....	18
2.1. <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes (ECEP).....	18
2.2. <i>Escherichia coli</i> entéro-toxinogènes (ECET).....	18
2.3. <i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs (ECEI).....	18
2.4. <i>Escherichia coli</i> entéro-hémorragiques (ECEH) ou producteurs de vérotoxines (VTEC) .....	18
2.5. <i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatifs (ECEAg) .....	18
2.6. <i>Escherichia coli</i> à adhésion diffuse (ECAD).....	18
b. Pouvoir pathogène pour l'animal.....	19
3.6. Traitement .....	19
3.6.1. Infections intestinales.....	19
3.6.2. Autres infections.....	19
4. Hémocultures.....	19
4.1. Septicémies.....	19
4.2. Diagnostic par hémoculture.....	20

## **Matériel et Méthodes**

1. Lieu de de travail .....	22
2. Prélèvement.....	22
3. Matériel .....	22
a. Milieux de culture.....	22
4. Méthodes.....	23
Tests biochimiques et bactériologiques.....	23
4.1. Diagnostic indirect de la brucellose au laboratoire.....	23
a) Epreuve à l'antigène tamponné au Rose Bengale (EAT au RB).....	23

b) Sérodiagnostic de Wright en tubes (S.A.W).....	25
4.2. Diagnostic direct de la brucellose au laboratoire.....	26
5. Enrichissement .....	27
6. Isolement et purification.....	27
7. Identification.....	27
7.1. Caractère macroscopique.....	27
7.2. Caractère microscopique.....	28
7.3. Recherche de la catalase.....	28
7.4. Test d'oxydase .....	28
7.5. Identification par la galerie API 20E .....	28
8. antibiogramme.....	29
9. Conservation des souches.....	29

## **Résultat et Discussions**

1 Diagnostic Indirect de la brucellose au laboratoire .....	30
a) L'épreuve à l'antigène tamponné au Rose Bengale (EAT au RB).....	30
b) Sérodiagnostic de Wright en tubes (S.A.W).....	32
2. Diagnostic direct de la brucellose au laboratoire.....	33
3. Tests bactériologiques des souches isolées .....	34
a. Identification des souches isolées .....	35
1. Etude macroscopique.....	35
2. Etude microscopique et coloration de Gram.....	36
3. Identification biochimique .....	37
3.1. Test catalase .....	37
3.2. Test oxydase.....	38
3.3 Test de coagulasse.....	38
3.4. Identification biochimique par le système miniaturisé API.....	39
b. Antibiogramme.....	40
Conclusion.....	42
Référence bibliographique.....	I
Annexes.....	III

# Résumé

Les moyennes de diagnostics des différentes infections humaines occupent une place importante en pathologie infectieuse en raison de leur fréquence et de leur gravité, tant à l'hôpital que dans les populations. Le diagnostic microbiologique et le traitement de ces infections imposent l'identification correcte de l'agent étiologique en vue d'une bonne prise en charge thérapeutique. C'est dans cette perspective que nous avons entrepris d'élaborer une approche pour permettre mieux connaître les moyenne de diagnostiquer et utiliser au laboratoire de santé et de suivre une démarche simple, cohérente et fiable pour une bonne identification de ces différentes espèce agressif, *Staphylococcus aureus* et des bacilles à Gram négatif (*E. coli* et *Brucella*).

Dans notre étude, plusieurs phases dans l'identification peuvent être distinguées depuis la gélose d'isolement jusqu'à l'impression des résultats.

En effet, il nous a permis de faire une identification à deux niveaux différents:

- étude bactériologique (isolement des bactéries suivie d'une identification biochimiques)
- étude sérologique (test de rose Bengale et test de Wright pour les brucellas).

**Mots clés :** diagnostique, infection, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella*.

## **Abstract**

Diagnostic averages for different human infections play an important role in infectious pathology due to their frequency and severity, both in hospitals and populations. Microbiological diagnosis and treatment of these infections requires the correct identification of the etiologic agent for a good therapeutic management. It is in this perspective that we have undertaken to develop an approach to better know the mean of diagnostics and to laboratory of health and to follow a simple, coherent and reliable procedure for a good identification of these different aggressive species, *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacilli (*E. coli* and *Brucella*).

In our manuscript, several phases in the identification can be distinguished from the isolation agar until the results are printed.

Indeed, it allowed us to make an identification at two levels:

- bacteriological study (isolation and biochemical identification of bacteria).
- serological study (Rose Bengal test and Wright test for *Brucella*).

**Keywords:** Diagnosis, infection, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Brucella*.

## ملخص

إن طرق تشخيص مختلف الإصابات الجرثومية البشرية يلعب دورا هاما في تحديد وتيرت و حدة الأمراض المعدية ، سواء ذلك في المستشفيات او داخل التجمعات السكانية، حيث ان تشخيص وعلاج هذه الالتهابات الجرثومية يفرض التحديد الصحيح لأسباب المرض و ذلك لإعطاء نتائج علاجية جيدة وفعالة.

من هذا المنطلق قمنا بدراسة السبل التشخيصية وذلك بتوضيح الطرق المتبعة في مختبرات الصحة للتحديد المناسب لهذه الأنواع الممرضة، والمكورات العنقودية الذهبية والبكتيريا سالبة الجرام (*Brucella* و *E. coli*).  
اثناء دراستنا لتحديد اسباب هاته الالتهابات قمنا بـ

- تحديد وعزل البكتيريا الممرضة والمتسببة في عدة التهابات على عدة مستويات وتحديد خصائصها البيو كيميائية (*Staphylococcus aureus* و *E. coli*).

- تحديد بعض الاجسام المضادة المفرزة ضد نوع محدد من البكتيريا والتي تعذر عزلها مثل بكتيريا الحمى المالطية) وذلك عن طريق مصل الدم.

الكلمات الدالة: التشخيص، العدوى، المكورات العنقودية الذهبية، *E. Coli*. الحمى المالطية.

# Introduction

Il existe de nombreux manuels ou guides de bactériologie permettant d'acquérir des connaissances de base, ou fondamentales, sur les bactéries et les maladies dont elles sont responsables. De plus, les germes une fois identifiés, ces outils permettent des comparaisons de souches dans une perspective épidémiologique. Les laboratoires de bactériologie ont un rôle croissant dans la détection de porteurs « à risque » du fait d'une espèce ou souche bactérienne ou d'une résistance aux antibiotiques particuliers (François *et al.*, 2011).

La majorité des maladies infectieuses émergentes chez l'Homme sont des zoonoses, c'est-à-dire qu'elles sont naturellement transmissibles de l'espèce animal à l'espèce humaine et vice-versa. La plupart de ces maladies trouvent leur origine au sein de la faune sauvage et leur incidence ne fait qu'augmenter depuis 1940 (Jones *et al.*, 2008). Cependant, certains agents pathogènes se sont vus d'abord transmis à des populations sauvages saines à partir de troupeaux domestiques infectés, celles-ci pouvant représenter alors un danger de réinfection pour les cheptels domestiques.

C'est le cas de la brucellose, une zoonose dont l'émergence et la réémergence récentes dans des populations sauvages et domestiques amènent de nouvelles interrogations concernant l'éco-épidémiologie de cette maladie. De plus, s'agissant d'une maladie multi-hôtes, il apparaît essentiel de déterminer quel rôle est joué par chaque espèce capable de développer l'infection (Rhyan et Spraker, 2010).

*Staphylococcus aureus*, comme toute bactérie pyogène, est à l'origine d'infections suppuratives. Il s'agit le plus souvent d'auto-infections à partir de la flore endogène, mais l'origine peut aussi être exogène ; c'est le cas des toxi-infections (François *et al.*, 2011).

Les familles des entérobactéries et des bacilles à Gram négatif non fermentaires comptent actuellement plus de 100 espèces bactériennes. Mais dans les laboratoires ne sont isolées, avec une certaine fréquence, qu'une vingtaine d'espèces bactériennes qui peuvent présenter un intérêt médical, voire même être potentiellement pathogènes et qui doivent être identifiées correctement quels que soient les moyens techniques mis en œuvre. L'identification de ces bactéries bénéficie depuis de nombreuses années déjà de l'existence de plusieurs méthodes :

- galerie classique avec un nombre limité de caractères ;
- galeries API qui sont très performantes (Farmer, 1999).

Les objectifs de la démarche de l'analyse bactériologique sont divers :

- Le plus fréquemment, il s'agit pour le laboratoire de mettre en évidence la ou les bactéries responsables d'une infection, d'effectuer une identification précise des pathogènes et de tester leurs sensibilités aux antibiotiques habituellement actifs contre ces souches bactériennes.

- Dans certains cas, il s'agit de s'assurer que la bactérie initialement responsable de l'infection pour laquelle un traitement antibiotique a été entrepris est bien éradiquée.

Les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne sont de deux ordres, les méthodes de diagnostic direct et les méthodes de diagnostic indirect.

Les méthodes mettant en évidence les bactéries dans leur intégralité sont fondées essentiellement sur les techniques de microscopie en absence de coloration (état frais) ou après coloration et sur les techniques sur milieu de culture.

Les méthodes de diagnostic indirect correspondent aux techniques de détection d'anticorps développés par l'organisme infecté en réponse à l'agression par la bactérie pathogène. Il s'agit dans ce cas des méthodes de sérodiagnostic.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude. Elle se donne comme objectif:

- d'évaluer les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne due à la présence de *Brucella*;
- d'évaluer les moyens de diagnostiquer une infection due aux *Staphylococcus* et aux *E. coli* (Entérobactéries).

# Synthèse bibliographique

## 1. Genre *Brucella*

### 1.1 Historique

La brucellose humaine a été clairement identifiée (entité nosologique avec la " fièvre de l'île") par les médecins militaires anglais dont A.J. Marston en 1859 sur l'île de Malte. L'agent pathogène de la brucellose a été découvert par David Bruce, bactériologiste anglais qui l'a isolé de la rate d'un malade atteint d'une infection non typhoïdique et dénommé *Micrococcus melitensis* (Dumas *et al.*, 1958). Par la suite, Bang en 1896, a mis en évidence dans les sécrétions génitales de vaches ayant avorté et dans le liquide stomacal des avortons un microbe nommé *Bacillus abortus* qui ressemble beaucoup à *M. melitensis* (Sow, 2011).

En 1897, A. Wright décrit une approche diagnostique par la mise en évidence d'agglutinines sériques (séroagglutination lente en tube). Ensuite, Zammit, en 1905, a isolé *M. melitensis* dans le sang et dans le lait de chèvres été démontré comme agent de contagion de la brucellose humaine. Enfin, Traun, en 1914, a découvert la troisième variété de *Brucella*, *B. suis* qui est l'agent de l'avortement des truies. Jusqu'en 1918, ces trois variétés de *Brucella* étaient considérées comme des espèces distinctes, mais Evans, en 1918, a le mérite de montrer qu'elles doivent être classées dans le même genre et proposa la création du genre *Brucella* en l'honneur de David Bruce par ce qu'elles possèdent la même structure antigénique (Sow, 2011).

### 1.2 Répartition géographique

La brucellose (dénommée également fièvre de Malte) est présente partout dans le monde mais elle est bien contrôlée dans la plupart des pays développés. La maladie clinique est encore courante dans le dans le bassin méditerranéen, le Moyen-Orient, en Asie, en Afrique du Sud et en Amérique centrale.

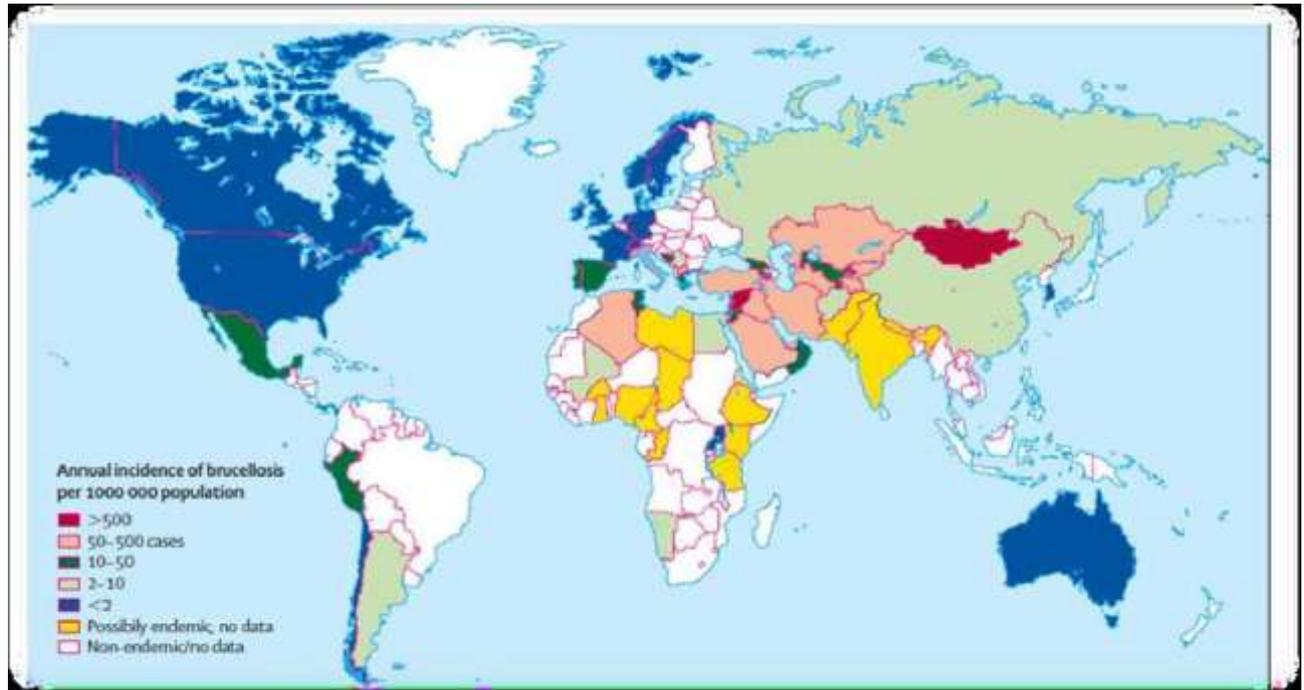
Les espèces de *Brucella* varient dans leur répartition géographique. Le bassin méditerranéen (et surtout l'Afrique du Nord) a toujours été classiquement considérée comme zone endémique pour la brucellose. Selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE), l'incidence de la brucellose en Algérie occupe le 10<sup>ème</sup> rang dans le classement des pays les plus touchés par la brucellose dans le monde avec 84,3 cas annuels par million d'habitants. On pense même que la brucellose est endémique sur la frontière entre le Maroc et l'Algérie (Abadan, 2014).

Un long silence épidémiologique a été observé pendant plusieurs années; jusqu'à l'apparition d'une poussée épidémique du Brucellose en 1984 à Ghardaïa avec plus de 600 cas cliniques dont 248 confirmés par la sérologie à l'institut Pasteur d'Alger.

Une recherche menée dans le cadre des enquêtes, montre que la brucellose est loin d'être une

infection localisée ou sporadique (comme le laissait supposer les rares données bibliographiques). Ainsi donc, dans notre pays la brucellose animale n'a été recherchée que lorsque l'homme est le révélateur.

En effet, le foyer de Ghardaïa incita à une enquête épidémiologique à l'échelle nationale effectuée par la collaboration étroite entre les services médicaux et vétérinaires.



**Figure1.** Carte géographique de la distribution mondiale de la brucellose (URL1).

A Ghardaïa, Huit cents dix-neuf (819) cas de brucellose humaine ont été diagnostiqués depuis le premier trimestre de l'année 2016 à travers les différentes localités de la wilaya de Ghardaïa, a déclaré l'assistant publique de la Santé (APS) auprès des services de la prévention à la direction locale de la Santé et de la Population (DSP 2016).

L'ensemble de ces personnes affectées par cette anthro-zoonose ont été pris en charge par les structures sanitaires réparties sur le territoire de la wilaya et leur état de santé est hors de danger, selon le responsable de la prévention à la DSP.

Considérée comme une pathologie "rare" dans plusieurs pays du bassin méditerranéen, cette recrudescence des cas de brucellose humaine observée dans la wilaya de Ghardaïa est "alarmante", a souligné le responsable de la prévention, précisant que ces cas sont contractés au contact des animaux d'élevage, à la consommation de lait cru ou de produits laitiers à base de lait cru notamment la "Kamaria", un fromage traditionnel du terroir très prisé à Ghardaïa.

Selon les statistiques de la DSP, le nombre de cas enregistré du 1<sup>er</sup> janvier au 14 avril 2016 a dépassé

le nombre cumulé et enregistré durant les trois dernières années (427 cas en 2015, 277 en 2014 et 116 en 2013).

### 1.3. Définition

La brucellose est une maladie infectieuse, contagieuse à l'homme, commune à de nombreuses espèces animales. Elle est due à des bactéries appartenant au genre *Brucella*. Plusieurs espèces de ce genre (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. pinnipediae*, etc.) au sein desquelles il existe plusieurs biovars, sont incriminées dans l'infection naturelle de plusieurs espèces animales comme les bovins, les petits ruminants, les porcins, les rongeurs, les carnivores et d'autres mammifères, y compris l'homme (Clotilde, 2006).

C'est une maladie de répartition mondiale considérée par l'OMS comme l'une des "sept zoonoses endémiques négligées". Elle est la zoonose bactérienne la plus fréquente dans le monde entier, avec plus d'un demi-million de nouveaux cas estimés chaque année. C'est la zoonose la plus importante dans le pourtour du bassin méditerranéen, mais dont l'importance hygiénique et économique est diversement perçue à travers le monde (Abadan, 2014).

### 1.4. Agent pathogène

#### a)-Germe

Le genre *Brucella* est classé dans le groupe *Alpha-Proteobacteria* et dans la famille des *Rhizobiaceae* (Maurin *et al.*, 2009). *Brucella* est un petit cocco-bacille à Gram négatif, immobile, de 0,6 à 1,5 µm de long sur 0,5 µm à 0,7 µm de diamètre, non sporulé, non capsulé et aérobic strict. Les *Brucella* sont des bactéries à développement intracellulaire facultatif, et de croissance optimale à 34°C-35°C, en milieu enrichi au sang (Maurin *et al.*, 2009). Les brucelles sont des bactéries à Gram négatif appartenant toutes au genre *Brucella*. Elles sont réparties en huit espèces : *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. pinnipediae* et *B. cetacea*. Certaines espèces sont des pathogènes avérés pour l'homme et se subdivisent en plusieurs biovars, avec une pathogénicité variable (Tableau 1).

#### b)- Réservoir

Le réservoir animal des *Brucella* est constitué de nombreux mammifères terrestres, mais aussi marins. Les animaux d'élevage (bovins, ovins, caprins) sont la première source d'infection chez l'homme, mais des bactéries se sont étendues à certains mammifères sauvages et marins. La pathogénicité de la bactérie varie en fonction des espèces (Maurin *et al.*, 2009) (Tableau1).

**Tableau 1.** Principales espèces de *Brucella* (Anses, 2001).

Spèce	Répartitions géographique principale	Hôte animal habituel	Pathogénicité pour l'homme
<i>B. abortus</i>	Ubiquitaire	Bovins, ongulés sauvages	Modérée
<i>B. melitensis</i>	Bassin méditerranéen, Moyen Orient	Ovins, caprins, ongulés sauvages	Forte
<i>B. suis</i>	Amérique, Asie, Océanie	Suidés	Forte
<i>B. suis</i>	Europe centrale et occidentale	Suidés, lièvres	Faible
<i>B. suis</i>	Amérique du Nord, Russie	Rennes	Modérée
<i>B. suis</i>	Russie	Rongeurs sauvages	Forte
<i>B. canis</i>	Ubiquitaire (fréquence élevée en Amérique du sud)	Chiens	Faible
<i>B. ovis</i>	Bassin méditerranéen	Ovins	Nulle

### 1.5. Transmission

La contamination se réalise de différentes manières :

- Par ingestion d'aliments contaminés : lait et produits laitiers non pasteurisés issus d'animaux infectés, plus rarement crudités (aliments consommés crus) contaminées par du fumier ou exceptionnellement viande insuffisamment cuite,
- Par contact direct (pénétration de la bactérie par voie cutanée ou muqueuse qui est favorisée par des blessures) avec des animaux malades, morts (carcasses) ou vivants, ou leurs produits :
  - Urines, selles
  - Produits d'avortements, de mise bas (placenta)
  - Sécrétions génitales.
- Aussi, mais rarement, par inhalation (de poussières de litière, d'aérosols contaminés) (Patrick *et al.*, 1992)
- Par contact accidentel avec des produits biologiques lors de manipulations de laboratoire.

La transmission d'une personne à l'autre est extrêmement rare et très peu décrite. Le personnel médical œuvrant dans des régions à haute endémicité peut éventuellement courir un risque de contracter la brucellose s'il prend part à des opérations chirurgicales ou des soins obstétricaux (Maurin et Brion, 2009). Lorsque la transmission est alimentaire ou aérienne, des épidémies peuvent survenir.

## 1.6. Incubation

La brucellose est une maladie chronique dont la physiopathologie fait intervenir plusieurs phases successives (Chakroun et Bouzouaia, 2007). La durée d'incubation est très variable, de 5 à 60 jours, et habituellement de 3 à 4 semaines, mais peut être plus longue (plusieurs mois). Après une phase de pénétration et de multiplication ganglionnaire, les *Brucella* se dispersent par voie sanguine ; ces formes de dissémination initiale sont dites aiguës (Patrick *et al.*, 1991). La brucellose se caractérise dans sa phase aiguë par une septicémie d'origine lymphatique, les bactéries colonisent les organes riches en cellules réticulo-histiocytaires dénommées également macrophage du tissu conjonctif (ganglions, foie, rate, tissus osseux, génital, etc.) où vont se constituer des foyers bactériens intracellulaires entourés d'une réaction inflammatoire histiomonocytaire et lymphocytaire (Chakroun et Bouzouaia, 2007).

## 1.7. Signes cliniques

L'Homme est susceptible de contracter la brucellose à *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* et très rarement *B. canis*, mais nous nous focaliserons ici sur la «Fièvre de Malte», regroupant les formes les plus sévères provoquées par *B. melitensis*. Après huit à vingt jours d'incubation, différents profils cliniques peuvent être observés. L'infection est très souvent asymptomatique et se réduit alors à la production d'anticorps spécifiques, sans aucun symptôme particulier signalé. Cependant, des formes aiguës sont également rencontrées et se traduisent par de nombreux signes, associés ou non : fatigue, migraines, douleurs musculaires et/ou articulaires, sueurs froides entre autres.

La traduction clinique de l'infection peut parfois se réduire à l'atteinte d'un organe ou d'un système en particulier : arthrite (hanche, épaule et genou essentiellement), des formes cutanées ont également été décrites comme étant des « allergies » brucelliques. Les symptômes pouvant perdurer plus de six mois, l'affection brucellique est alors qualifiée de chronique (Freycon, 2015).

Les symptômes sont très variés, avec une maladie plus sévère pour *B. melitensis* et *B. abortus*, la première étant la plus pathogène pour l'Homme et provoquant même de nombreux décès.

La brucellose est asymptomatique dans environ un cas sur deux. Son incubation dure cinq à trente jours ou plus, puis il se développe une maladie plus ou moins sévère.

Dans la forme aiguë, on observe une grande faiblesse, des douleurs musculaires et articulaires, des maux de tête, une forte fièvre (ondulante pour *Brucella abortus* ou fièvre de Malte pour *Brucella melitensis*), des tremblements, une hépatomégalie, une splénomégalie, des sudations nocturnes d'odeur caractéristique, ainsi que des troubles digestifs (parfois avec des constipations).

Les localisations cliniques sont donc aussi nombreuses que diverses: ostéo-articulaire, urogénitale,

nerveuse, hépatique, cardiovasculaire, glandulaire.

L'évolution est possible sur plusieurs semaines ou mois, et des complications peuvent apparaître, comme des encéphalites, névrites périphériques, arthrites suppurées, endocardites, etc. La mortalité est généralement négligeable dans ces cas, et la forme chronique dure quant à elle plusieurs années, sans foyer d'infection localisée.

### 1.8. Diagnostique de la brucellose au laboratoire

Le diagnostic est un ensemble de moyens permettant de confirmer l'origine d'une infection. Ces moyens sont variés et se traduisent soit par un diagnostic direct, soit par un diagnostic indirect. Le diagnostic direct met en évidence la cellule bactérienne ou ses constituants. Les méthodes de biologie moléculaire font partie des techniques de diagnostic direct. Le diagnostic indirect de la brucellose peut faire appel à plusieurs techniques sérologiques (Sow.2011). Le diagnostic de brucellose est confirmé par l'isolement de *Brucella* ou la sérologie (Chakroun et Bouzouaia, 2007).

#### 1.8.1. Diagnostique bactériologique directe : isolement en culture

La recherche directe de *Brucella* spp. est basée sur la culture et l'isolement sur milieu sélectif. La durée d'incubation, la culture en aérobiose ou en anaérobiose, l'aspect des colonies, la présence d'hémolyse et l'antibiogramme sont ainsi pris en compte pour l'identification et la caractérisation.

En brucellose humaine, divers prélèvements correspondant à des sites de localisation de *Brucella* peuvent être mis en culture, tels que des prélèvements du liquide cébrospinal, de la moelle osseuse ou encore de pus. Mais la recherche de *Brucella* se fait principalement à partir du sang (hémoculture) du patient (Sow, 2011).



**Figure 2.** Milieu gélose chocolat.



**Figure3.** Milieu biphaseique (Castaneda)

### 8.1.1. Caractères de culture

Les brucelles sont habituellement cultivées à 37°C, ce sont des bactéries aérobies strictes, poussent pauvrement et lentement sur les milieux habituels tels que les milieux pour hémoculture ou gélose chocolat (plus de 48 heures à 37°C et même parfois plusieurs semaines) et systématiquement repiquées avant d'être considérées comme négatives (Patrick *et al.*, 1992). Pour obtenir des colonies à partir d'un produit pathologique certaines espèces (*B. abortus*) et biotypes sont exigeantes en gaz carbonique (CO<sub>2</sub>).

L'identification des *Brucella* repose sur un ensemble de caractères biochimiques, la culture lente et l'aspect des colonies, est fondée sur les caractères positifs suivants: aérobiose stricte, oxydase, uréase, catalase, nitrate réductase (Avril *et al.*, 1992).



**Figure 4.** caractères biochimiques du *Brucella* ( URL3)

La culture constitue donc le diagnostic de certitude. Les *Brucella* sont des germes nutritionnellement exigeants (et à culture lente). L'utilisation de milieux sélectifs est donc indispensable, les prélèvements étant très souvent contaminés par d'autres bactéries dont la croissance peut altérer celle des *Brucella*. L'espèce bactérienne et le biovar seront précisés dans un but épidémiologique (Chakroun, Bouzouaia, 2007). Cette méthode peut s'avérer longue et conclure par erreur à l'absence de ce germe d'intérêt, c'est pourquoi la méthode PCR peut alors être indiquée. Se basant sur la détection de l'ADN de la bactérie, cette technique s'affranchit du nombre faible de bactéries, de leur viabilité ou de la présence des contaminants. De nombreuses études ont démontré la bonne sensibilité de la PCR menées sur des cultures de *Brucella* (Costa *et al.*, 1996).

Cependant, très peu d'études ont cherché à valider la cette technique sur des prélèvements effectués sur le terrain, c'est pourquoi la PCR complète les résultats obtenus par culture sans pour autant la remplacer. Cette méthode, néanmoins couteuse, est rapide et présente moins de risque de contamination pour les opérateurs (Freycon, 2015).

## 1.8.2 Diagnostic sérologique indirect

Les LPS (lipopolysaccharides) de la membrane externe comporte les principaux antigènes de surface impliqués dans les phénomènes d'agglutination. Il supporte ainsi des antigènes dénommés A et M dont la distribution et la proportion varient entre les différentes souches de *Brucella*. Cette particularité est d'importance majeure puisqu'elle permet de distinguer les différents biovars d'une même espèce, par utilisation de sérum mono spécifique dirigé contre chacun de ces antigènes (Freycon, 2015).

### 1.8.2. 1. Epreuve à l'Antigène Tamponné au Rose Bengale (EAT au RB)

Le teste au rose Bengale (ou Epreuve à l'Antigène Tamponné : EAT), C'est une technique qualitative, d'agglutination active directe sur lame, obtenue en mélangeant une goutte de sérum du patient et une goutte d'Ag (*Brucella abortus*, inactivée par la chaleur et par les phénolées) coloré au Rose Bengale (Clotilde, 2006).

L'agglutination (présence d'IgG) apparait dans les 4 minutes et doit être confirmée par des témoins (témoin positif et un témoin négatif). Pour l'interprétation, une absence d'agglutination signifie qu'il n'y a pas d'anticorps dans le sérum, tandis que l'existence d'une agglutination, aussi minime soit-elle, signale la présence d'anticorps anti-*Brucella*. Cette technique détecte des IgG, elle est très sensible, spécifique et reste longtemps positive. Elle est rapide, peu couteuse et demeure la méthode de référence pour le diagnostic sérologique de la brucellose humaine (Clotilde, 2006).

L'utilisation de ce test est recommandée pour confirmer la suspicion clinique, suivre l'évolution d'une infection et diagnostiquer les rechutes. C'est un moyen simple et facile qui permet la détection d'anticorps à partir des stades avancés de la maladie, il est spécialement conçu et largement utilisé pour le diagnostic de la brucellose chronique et le suivi du traitement. Il permet la détection, en une seule étape aussi bien des anticorps agglutinants IgM et IgG que des anticorps non agglutinants (Satish et Tanveer, 2015).

La diminution rapide des titres en anticorps (AC) associée à l'amélioration de la condition clinique du patient constituent un bon indicateur qui témoigne d'une évolution favorable vers la guérison (Abadan, 2014).

C'est une des méthodes les plus faciles à mettre en œuvre et la plus largement utilisée dans les hôpitaux publiques et les cliniques privés pour la mise en évidence des anticorps brucelliques dans les sérums (Clotilde, 2006).

### 1.8.2. 2. Sérodiagnostic de Wright en tube

C'est une technique d'agglutination lente en tubes. Des dilutions de sérum à titrer sont mises en présence de quantités constantes d'antigènes brucelliques, puis ces dilutions sont mises à incuber une nuit à 37°C.

Lorsque le sérum est positif, il se forme des complexes antigène/anticorps qui précipitent en formant un culot, tandis que le surnageant devient transparent. Lorsque le sérum est négatif, le mélange réactionnel reste opaque.

Ce test, moyennement sensible et très peu spécifique, n'est pas reconnu comme test de référence par les organismes internationaux (Clotilde, 2006).

### 1.8.2.3. Examens complémentaires

Au plan biologique, la brucellose s'accompagne d'une leuco-neutropénie ou d'une leucocytose normale, parfois d'une thrombopénie (une diminution du nombre de plaquettes sanguines), d'un syndrome inflammatoire modéré ou franc (élévation de la vitesse de sédimentation ou de la protéine C réactive sérique) et d'une cytolysse modérée (Chakroun et Bouzouaia, 2007).

#### a. ELISA (Enzyme Like Immuno Sorbent Assay)

Des méthodes d'immuno-enzymatiques ELISA (de l'anglais *enzyme-linked immuno sorbent assay*, littéralement « dosage d'immuno adsorption par enzyme liée » ont également été mises au point afin de mettre en évidence des anticorps dirigés spécifiquement contre *Brucella*, mais ceux-ci restent rarement utilisés (Freycon, 2015).

Pour la réalisation de ce test, le LPS de *Brucella* est fourni fixé sur les parois des puits des microplaques en polypropylène. Les sérums ou laits à tester sont dilués et mis à incuber dans les puits. S'il y a des anticorps spécifiques, il se forme alors des complexes LPS/anticorps fixés sur les parois du puits. Après lavage, une immunoglobuline anti anticorps couplée à une enzyme est mise à incuber, et ce conjugué se fixe sur l'immun complexe. Après un deuxième lavage, le substrat de l'enzyme (TMB) est ajouté dans les puits. Si l'immun complexe est présent, l'enzyme assure la transformation du substrat en un composé de couleur bleu, devenant jaune après blocage. L'intensité de la coloration mesure le taux d'anticorps présents dans l'échantillon. Le seuil de positivité est fixé à partir d'un échantillon de contrôle positif à introduire sur chaque micro plaque (Clotilde, 2006).

#### b. Fluorescence Polarisation Assay

C'est une technique simple et rapide de mesure d'interaction antigène/anticorps, qui peut être employée aussi bien en laboratoire que sur le terrain (elle est recommandée comme test de référence dans le cadre du commerce international).

Le mécanisme de ce test est basé sur la rotation aléatoire des molécules en solution. La taille des molécules étant le principal facteur influençant le taux de rotation, qui y est inversement proportionnel (une petite molécule tourne plus vite qu'une grosse). Si une molécule est marquée avec un fluorochrome, le temps de rotation pour faire un angle de  $68,5^\circ$  peut être déterminé en mesurant l'intensité de la lumière polarisée dans des plans horizontaux et verticaux.

Une grosse molécule émet ainsi plus de lumière dans un plan simple (plus polarisée) qu'une petite molécule, qui tourne plus vite et qui émet plus de lumière dépolarisée.

La sensibilité et la spécificité de ce test sont proches de celles de l'ELISA. Cependant, l'interprétation des résultats n'a pas encore été standardisée (Clotilde, 2006).

**Tableau 2.** Intérêt des examens complémentaires de pratique courante au cours des différentes phases de la maladie (Chakroun, Bouzouaia. 2007)

	Phase aiguë	Phase sub aiguë	Phase de focalisation
Hémocultures	++	++	-
Sérodiagnostic	++	++	-
de Wright IFI ou ELISA	+	+++	++

IFI : immunofluorescence indirecte

ELISA : Enzyme Like Immuno Sorbent Assay

## 1.9. Traitement

### 1.9.1. Traitement curatif

Le traitement curatif de la brucellose repose essentiellement sur l'antibiothérapie. Son but est de traiter la maladie et d'éviter la survenue de complications et de rechutes. Les antibiotiques prescrits doivent être actifs contre *Brucella*, avoir une bonne diffusion intracellulaire et une activité conservée en intracellulaire.

Les antibiotiques les plus actifs sont les cyclines (oxytétracycline et doxycycline), les aminosides (streptomycine et gentamicine) et la rifampicine. Tous ces antibiotiques sont bactéricides *in vitro* vis-à-vis de *Brucella*. Les cyclines et la rifampicine conservent leur activité en milieu intracellulaire et en pH acide, alors que les aminosides ont surtout une activité extracellulaire (Tableau 3).

La prescription des phénicolés (surtout le chloramphénicol) est actuellement abandonnée en raison de leur faible activité (CMI : 1,5 à 3 mg/l) et leur héματο-toxicité. Les fluoroquinolones ont une bonne biodisponibilité orale et une bonne diffusion intracellulaire (Chakroun et Bouzouaia, 2007).

**Tableau 3.** Principaux antibiotiques prescrits au cours de la brucellose (Chakroun, Bouzouaia, 2007)

Famille	Molécules	Posologies adulte et voies d'administration	Effets Indésirables	Précautions d'emploi
Cyclines	Oxytétracycline Doxycycline	35mg/kg/j PO 200 mg/j PO	Photosensibilité	Contre-indication: femme enceinte et enfant < 8 ans
Aminosides	Streptomycine Gentamicine	1 g/j IM 5 mg/kg/j IM	Néphrototoxicité	Adaptation de la posologie en cas d'insuffisance rénale
Rifamycines	Rifampicine	15 mg/kg/j PO	Coloration rouge des urines Manifestations immuno allergiques (prise discontinuée)	
Sulfamides	Triméthoprime Sulfaméthoxazole	8mg/kg/j 40 mg/kg/j PO	Leucopénie, anémie Allergie	Surveillance NFS Contre indication: femme enceinte
Fluoroquinolones	Ofloxacine Ciprofloxacine	400mg/j 1,5 g/j	Photosensibilité Tendinopathie	

PO : par voie orale. IM : intramusculaire.

### 1.9.2. Prophylaxie sanitaire

La prophylaxie sanitaire a pour but d'éviter l'apparition et la propagation d'une maladie en n'ayant recours qu'à des moyens hygiéniques : désinfection, quarantaine, périmètre de sécurité, dépistage des individus malades, porteurs ou sains. Les mesures s'adaptent ainsi en fonction de la situation épidémiologique (Freycon, 2015).

## 2. *Staphylococcus aureus*

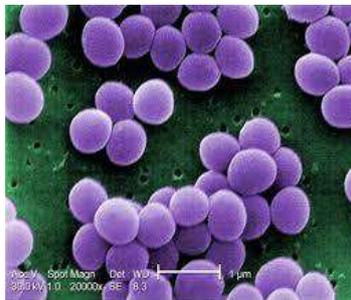
### 2.1. Historique

Les *staphylocoques* ont été découverts dans un pus en 1880 par Louis Pasteur. 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.*, 2000).

### 2.2. Morphologie

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 µm de diamètre; ce n'est qu'au cours de la lyse ou de la dégénérescence (veilles cellules) que parfois les cellules perdent leur affinité tinctoriale (pigmentaire) et peuvent devenir à Gram variable (El Kour, 2003). Ainsi, ils sont immobiles, non sporulés, ne possédant pas de capsule visible au microscope optique (sauf pour de très rares souches), d'autres forment des colonies mucoïdes sont entourées d'une pseudo-capsule (Couture, 1990).

Sur les cultures en milieu solide, ils se disposent en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de "grappes de raisin" (Fauchere, 2002). Alors qu'en milieu liquide, ils sont souvent isolés, en diplocoques, en tétrades ou en très courtes chaînettes (en générale de 3 à 5 éléments) (Couture, 1990).



**Figure 5.** Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)( URL4).

### 2.3. Caractères cultureux

Peu exigeants sur le plan nutritif, les staphylocoques sont aérobies anaérobies facultatifs (quelques souches exigent le CO<sub>2</sub> pour croître), et croissent bien sur les milieux usuels simples, de même que sur la plupart des milieux qui favorisent la croissance des bactéries à Gram positif. Certains facteurs de croissance sont indispensables (Vitamine B1, acide nicotinique) mais ils n'exigent pas de biotine ni de tryptophane, ils poussent en milieu synthétique contenant des sels, du glucose et un de quatorze acides aminés dont la cystéine. La température optimale de croissance est de 37°C et le pH optimal est de 7,5, mais de grandes variations sont tolérées (Couture, 1990).

En bouillon, la culture est rapide, en quelques heures un trouble homogène puis un dépôt sont

observés, il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide (Kloos *et al.*, 1975).

Le milieu de Chapman est particulièrement utilisé, il ne laisse généralement croître au bout de 24 à 48 heures que les staphylocoques, germes halophiles qui tolèrent des concentrations élevées de NaCl jusqu'à 7,5% ( qui inhibe pour cette raison, la plupart des autres germes), ce milieu sélectif rendu différentiel, par l'addition de Mannitol à 1% et d'un indicateur d'acidité : le rouge de phénol, permet à la fois d'isoler le staphylocoque à partir d'un prélèvement contenant un mélange de germes et nous oriente vers un *S. aureus* ou un *S. epidermidis* (Kloos *et al.*, 1990).

#### 2.4. Caractères physiologiques et biochimiques

Toutes les souches de *Staphylococcus* produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétoïne +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine (Kloos *et al.*, 1990). De plus, la plupart des souches de *S. aureus*, contrairement aux autres espèces, produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (Couture, 1990).

*Staphylococcus aureus* possède d'également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques (Ferron, 1984). Le métabolisme glucidique est particulièrement important. La plupart des sucres sont fermentés (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol), le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* (Fauchere, 2002; Fasquelle, 1974); mais il faut toujours procéder à son identification par l'étude de différentes propriétés biologiques et biochimiques (Fauchere, 2002).

Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase (Tableau 4). Cependant, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulase libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (Couture, 1990; Fauchere, 2002).

**Tableau 4.** Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus* (Fauchere, 2002).

Espèce <i>S. aureus</i>		Autres espèces de Staphylocoques
Aspects des colonies	Pigment doré	Blanches
Milieu de Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf <i>S. epidermidis</i>
Staphylo-coagulase	Positive	Négative

## 2.5. Pouvoir pathogène de *S. aureus*

*Staphylococcus aureus* est responsable de nombreux types d'infections chez l'homme et compte parmi les agents pathogènes les plus souvent isolés des infections nosocomiales et communautaires (Vincenot *et al.*, 2008; Kurlenda et Grinholc, 2012; Otto, 2012). Les infections suppuratives (avec pus) superficielles cutanéomuqueuses tels les furoncles, les folliculites, les sinusites et les otites sont les plus couramment rencontrées. Ces infections peuvent se compliquer par une diffusion hématogène de la bactérie ou par une extension locorégionale de l'infection. *S. aureus* est aussi responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires. Les infections non suppuratives d'origine toxique appelées toxémies staphylococciques sont, elles, dues à la diffusion de toxines à partir d'un foyer infectieux ou à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé. Ces toxémies regroupent les syndromes cutanés staphylococciques le choc toxique staphylococcique et les intoxications alimentaires par les entérotoxines (Foster, 1996; Harris *et al.*, 2002).

En plus des infections aiguës, *S. aureus* peut provoquer des infections chroniques. La plupart d'entre elles sont dues à la capacité de ce pathogène à adhérer sur les implants médicaux temporaires ou permanents (ex: prothèses orthopédiques, valves cardiaques) et à former un biofilm (von Eiff *et al.*, 2005; Harris et Richards, 2006; Bernard, 2006).

## 3. *Escherichia coli*

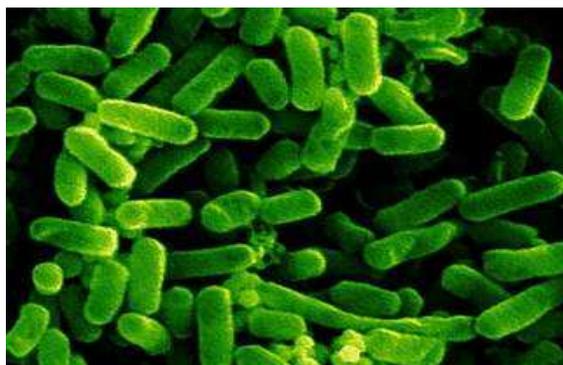
### 3.1. Historique

*Escherichia coli* est isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *E. coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les chercheurs d'un point de vue physiologique et génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire. Au cours des dernières décennies, le rôle de certaines souches d'*E. coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés (Debernat *et al.*, 1992).

### 3.2. Morphologies

*Escherichia coli* possède les caractères suivants:

- Ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6  $\mu\text{m}$  de long et 0,3 à 1  $\mu\text{m}$  de large;
- Mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles;
- Se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire;
- Acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz;
- Ne possédant pas d'oxydase et réduisant les nitrates en nitrites.



**Figure 6.** Aspect de la bactérie *E. coli* au microscope électrique (400 000 x). (URL5).

### 3.3 Caractères cultureux et métaboliques

La bactérie *E. coli* se développe en 24 heures à 37°C sur les milieux géloses en donnant de colonies rondes, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre, non pigmentées. Sur les milieux lactoses, les colonies sont généralement lactose positif. Sur gélose au sang elles peuvent être hémolytiques. Les principaux caractères positifs sont : mannitol, indole (sauf exceptions), ONPG (sauf exceptions). Les caractères suivants sont positifs de façon moins constante : mobilité, LDC, ODC, sorbitol. Les souches O157:H7, *Escherichia coli* Entero-hémorragique (E.H.E.C.) sont le plus souvent sorbitol (-) et décarboxylases (+), production de gaz lors de la dégradation du glucose. Les souches d'*E. coli* sont toujours négatifs pour les tests suivants: inositol, urée, TDA, VP, gélatinase, citrate de Simmons.

Les souches d'*E. coli* entéro-invasives ont souvent une faible activité métabolique (Debernat et al., 1992).

### 3.4 Diagnostic différentiel

Trois autres espèces d'*Escherichia* sont rarement rencontrées dans les prélèvements. Ce sont *E. hermannii*, *E. fergusonii* et *E. vulneris*.

**Tableau 5.** Quelque caractère distinctif d *E. coli* (Debernat et al., 1992).

	Indole	ODC	Saccharose	Pigment jaune	PGR	TRT
<i>E. coli</i>	+	d	d	-	d	-
<i>E. hermannii</i>	+	+	d	+	-	+
<i>E. fergusonii</i>	+	+	-	-	-	-
<i>E. vulneris</i>	-	-	-	+/-	-	-

+: positif, -: négatif, d: différent (selon les souches).

Des souches d'*E. coli* à la fois immobiles et agazogènes, peuvent parfois poser des problèmes d'identification avec les *Shigella*. La recherche de la lysine-décarboxylase et le test au citrate de Christensen sont généralement positifs avec les *E. coli*, alors qu'ils sont toujours négatifs avec les *Shigella* (Debernat, et al., 1992).

### 3.5. pouvoir pathogène

#### a. Pouvoir pathogène pour l'homme

##### 1. Infections extra-intestinales

###### 1.1. Infections urinaires

C'est une infection ascendante ou descendante, vésicale ou rénale, est principalement *E. coli* est tenu pour responsable de 60 à 80 % des infections des voies urinaires.

L'infection peut être prostatique, génitales, hépato biliaires ou digestives, méningées (surtout chez les nouveau-nés), septicémiques (le plus souvent secondaires à un foyer infectieux urinaire, biliaire, intestinal, gynécologique) (Debernat, et al., 1992).

###### 1.2. Infections intestinales

Les propriétés des types de *E. coli* responsables de diarrhées sont représentées dans le Tableau 6.

**1.2.1. *Escherichia coli* entéro-pathogènes (ECEP) :** ces souches sont responsables de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E. coli* G.E.I responsable de gastro-entérites infantiles dues à des colibacilles entéro-pathogènes.

**1.2.2. *Escherichia coli* entéro-toxinogènes (ECET) :** elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent aussi chez les voyageurs, elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays.

**1.2.3. *Escherichia coli* entéro-invasifs (ECEI) :** elles sont isolées de syndromes dysentériques (diarrhéique) tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif.

**1.2.4. *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (ECEH) ou producteurs de vérotoxines (VTEC) :** elles sont responsables d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragiques, ces souches sont responsables du syndrome hémolytique-urémique.

**1.2.5. *Escherichia coli* entéro-agrégatifs (ECEAg) :** ils peuvent être responsables de diarrhée persistante.

###### 1.2.6. *Escherichia coli* à adhésion diffuse (ECAD) :

Ces deux dernières catégories d'*E. coli* entéro virulent ont un rôle encore controversé dans la survenue de syndromes diarrhéiques. Les différents syndromes cliniques sont dus à des *E. coli* différentes (Debernat et al., 1992).

**Tableau 6.** propriétés des *E. coli* responsables de diarrhées (Debernat *et al.*, 1992).

<i>E.coli</i>	Entéro-pathogènes (ECEP)	Entéro-hémorragiques (ECEH)	Entéro-toxiques ECET	Entéro
Diarrhées	Aiguë et chronique	Sanglante	Liquide	Dysentérique
Cible	Enfants moins de 1 ans	Intoxication alimentaire	Enfants voyageurs et	Adultes et intoxication alimentaire

## b. Pouvoir pathogène pour l'animal

Certaines souches d'*E. coli* productrices de toxines ou possédant des propriétés invasives sont pathogènes pour les animaux et provoquent des diarrhées, ces diarrhées sont, par leur fréquence et la mortalité qu'elles entraînent, causes de pertes économiques importantes (Avril *et al.*, 2000).

### 3.6. Traitement

#### 3.6.1. Infections intestinales

Le traitement curatif d'une diarrhée aiguë est principalement un traitement symptomatique par la réhydratation. La diarrhée des voyageurs peut être prévenue par des mesures d'hygiène ou par la prise d'antibiotiques pour certains. Les fluoroquinolones ou le cotrimoxazole sont utilisés à titre curatif.

#### 3.6.2 Autres infections

Les souches d'*E. coli* sont généralement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles Gram négatif : amino-pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, triméthoprime-sulfaméthoxazole. Néanmoins cette sensibilité doit toujours être vérifiée par un antibiogramme (Debernat *et al.*, 1992).

## 4. Hémocultures

### 4.1. Septicémies

Une septicémie est un terme médical dont l'utilisation a été un peu abandonnée au profit du terme sepsis. Le sepsis est une pathologie qui peut être assimilée à une infection généralisée. Une septicémie se définit comme le passage répété de bactéries dans le sang (normalement stérile); qui est diffusé par la suite dans tout l'organisme. Le sepsis définit alors toutes les réactions de l'organisme en réponse à cette agression (Fauchère, 1990).

Les causes de sepsis sont nombreuses et peuvent concerner le plus souvent une atteinte bactérienne, plus rarement un autre type de germe. De même, l'infection initiale peut toucher n'importe quel tissu ou organe et se propager à d'autres endroits via la circulation sanguine. Suivant les symptômes présentés par le patient, on distingue le sepsis, le sepsis sévère, et le choc septique, de gravité croissante (Maurin et Brion, 2009).

Pour diagnostiquer un sepsis ou une de ses formes les plus graves, un prélèvement sanguin doit être effectué, et des cultures y seront pratiquées (c'est-à-dire une hémoculture). Ceci autorise la mise en évidence du germe incriminé dans le sepsis et permet d'adapter le traitement. D'autres examens seront orientés par les symptômes supplémentaires, pour rechercher la porte d'entrée du germe (Fauchère, 1990).

#### **4.2. Diagnostic par hémoculture**

Une hémoculture est un examen sanguin essentiel en maladie infectieuse. Il consiste en un prélèvement de sang veineux, qui est ensuite mis en culture afin d'y rechercher des germes. Il est effectué, si possible, avant la mise en route d'une antibiothérapie. On réalise en général 3 prélèvements différents, à quelques heures d'intervalle, effectués de préférence au moment d'un pic d'hyperthermie ou d'hypothermie ou lors de frissons qui signe une décharge bactériémique (Fauchère, 1990).

L'hémoculture consiste donc à mettre en culture un échantillon de sang, afin d'identifier un ou plusieurs germes. L'hémoculture permet également de réaliser un antibiogramme sur le germe retrouvé, et oriente ainsi le médecin dans le choix du traitement antibiotique.

Il est parfois nécessaire d'indiquer au laboratoire le type de germe recherché comme pour la listériose, les mycobactéries, les bactéries à croissance lente ou difficile (*Brucella*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Mycoplasme*, etc.) car le germe en cause nécessite un milieu de culture spécifique (Bactec, Isolator, etc.) et ne poussera pas sur les milieux usuels conventionnels (Fauchère, 1990).

##### **Prélèvement**

Faible quantité des bactéries dans le sang (1 bactérie/mL, trop peu pour un examen direct) donc il est nécessaire de prélever une quantité de sang importante (10 mL).

**Tableau 7.** Durée d'incubation des flacons d'hémoculture (Archambaud et Clave, 2008).

	Durée d'incubation (jours)	Commentaires
Hémoculture standard	5	Pour les systèmes manuels : 7 jours avec 2 lectures/jour les premières 48 heures et 1 lecture/jour après.
Endocardite infectieuse	14-30	Une durée d'incubation de 4 semaines est recommandée; avec réalisation de subcultures en cas de négativité des hémocultures après 48 heures et éventuellement après 7 jours d'incubation; cette démarche est lourde et, jusqu'à présent, il n'y a pas d'étude démontrant son utilité en cas d'utilisation d'un système automatisé.
Brucellose	10-21	Pour les systèmes manuels, une incubation de 21 jours semble indiquée même si la plupart des cultures deviennent positives durant la première semaine ; il est préférable d'utiliser un milieu diphasique pour éviter les subcultures. Pour les systèmes automatisés, il a été démontré que 95% des cultures se sont positivées en 7 jours; la prudence fait que la plupart des auteurs recommande une incubation de 21 jours avec éventuellement la réalisation de subcultures.

# Matériel et méthodes

## 1. Lieu de de travail

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire central de l'hôpital Dr. Tirichine Brahim (Sidi Abaz), Ghardaïa.

## 2. Prélèvement

Le prélèvement est un acte-clé de la phase pré-analytique. Le choix des échantillons, de leurs modalités de prélèvement, de transport et de conservation doivent être de qualité optimale, à défaut de quoi, les résultats des analyses risquent de n'avoir aucune utilité clinique.

Le préleveur est responsable d'étiqueter les récipients contenant l'échantillon biologique. Il faut mentionner l'identité, la date de naissance, le sexe du patient, ainsi que la nature de l'échantillon, la date et l'heure du prélèvement.

Les prélèvements des échantillons ont été effectués à partir du sang, du sérum et des urines des malades hospitalisés aux services de médecine de l'établissement hospitalier (service de chirurgie, et service des urgences), et quelques malades non hospitaliers.

Méthodes de prélèvement :

- Les prélèvements du sang ont été effectués dans des tubes à hémolyse sec, et pour les urines dans des boîtes stériles (après le rejet des premières urines du matin).
- Des renseignements à partir des registres pour l'étude rétrospective de la brucellose.

## 3. Matériel

Ecouvillons stériles, anse de platine, pipette Pasteur, pipette graduées, boîtes de Pétri, tubes à essais, tubes à hémolyse, lames et lamelles, étuve, bec Bunsen, vortex, disque d'antibiotique, et pied de coulisse.

### a. Milieux de culture

#### a.1. Milieux de culture liquide

Bouillon cœur-cerveille (BHIB)

#### a.2 Milieux de culture solide

- BCP
- Le milieu MacConkey: permet d'isoler les bactéries à Gram négatif, grâce à l'action des deux inhibiteurs le cristal violet et les sels biliaires (Biokar, 2009).
- Le milieu de Chapman : est un milieu sélectif, surtout, permettant la croissance des germes halophiles. La forte concentration en NaCl inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques (BIO-RAD, 2007).
- Gélose nutritive : pour la conservation des souches à court terme.

## b. Réactifs et autres produits

Galerie API20E.

Vogues Proskauer (VP1, VP2)

kovas, Endol.

Disque d'oxydase, huile de paraffine, eau oxygénée, eau distillé, violet de gentiane, lugol, Fuchsine et éthanol.

## 3. Méthodes

### Tests biochimiques et bactériologiques

#### 4.1. Diagnostic indirect de la brucellose au laboratoire

Deux tests sérologiques sont systématiquement réalisés à partir des prélèvements sanguins sur tube sec effectués. Après réception des tubes par le laboratoire ceux-ci sont centrifugés afin d'isoler le sérum.

- ❖ Pour une bonne étude sérologique toute demande d'analyse doit être accompagnée d'une fiche de renseignements (voir annexe)

#### a. L'épreuve à l'antigène tamponné au Rose Bengale (EAT au RB).

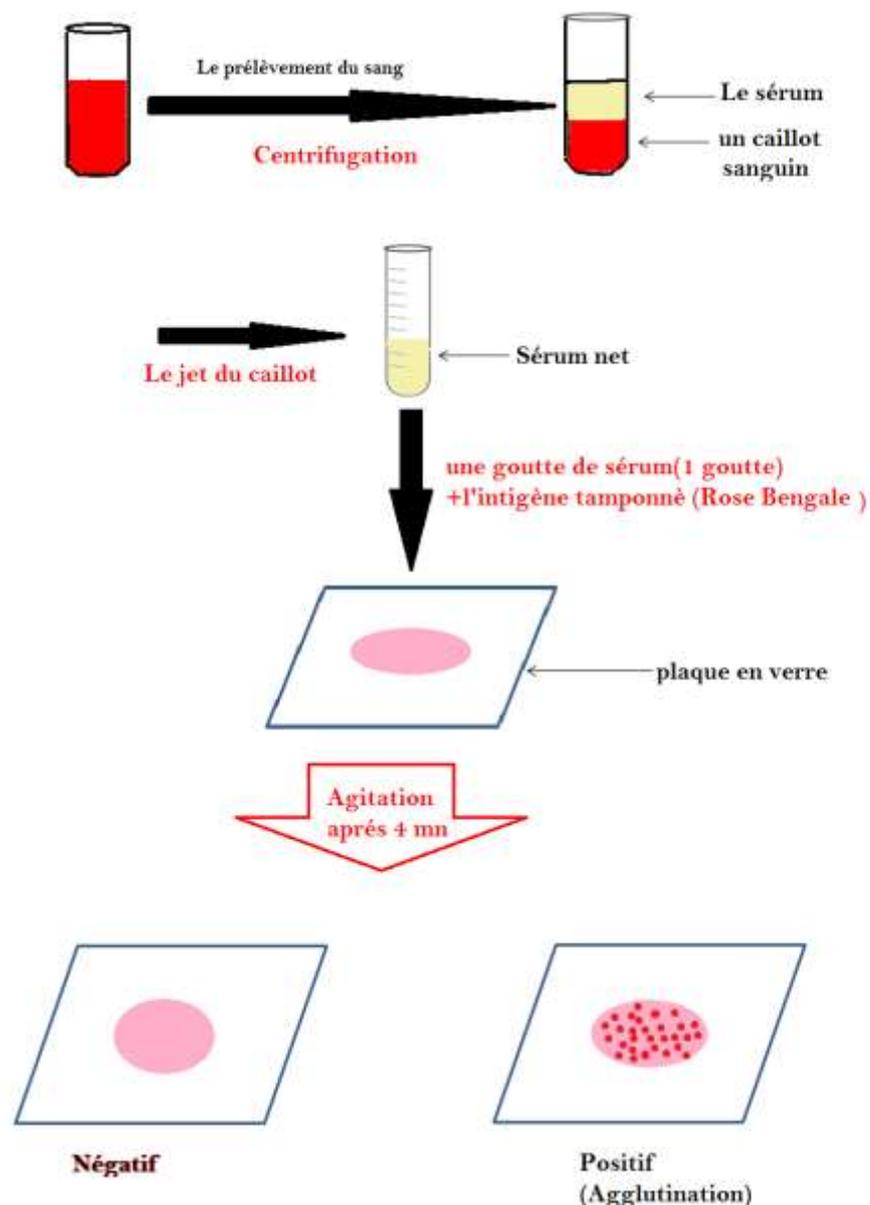
Le test au rose Bengale (appelé également épreuve à l'antigène tamponné) c'est un antigène pour le diagnostic de la brucellose humaine (il s'agit d'un test qualitatif).

- Pour notre étude nous avons utilisé la technique de test au rose Bengale : REACTIF Antigène brucellique pour test humain commercialisé par SPINREACTE- (Réf: 1205091) coffret de 30 teste présentè sous forme de compte-gouttes (1 goutte = 0,03 ml).



**Photo 1.** Antigène brucellique (rose Bengale).

- Mode opératoire (Figure 7)
- Placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C), 30 à 60 minutes avant le début du test (ne pas congeler).
- Agiter le réactif avant l'usage.
- Sur un cercle de la carte déposer 0,03 mL de sérum à tester et 0,03 mL d'antigène coloré au rose Bengale.
- Mélanger le sérum et antigène avec délicatesse (à l'aide d'un bâtonnet).
- Agiter lentement la carte pendant 4 min (exactement) à l'aide d'un agitateur de plaque.
- Après ce laps de temps lire immédiatement



**Figure 7.** Les étapes de réaliser le test rose Bengale (OMS).



**Figure 8.** Agitateur de plaque de Rose Bengale.

**b) Sérodiagnostic de Wright en tubes (S.A.W)**

**Principe :**

Le titre des anticorps d'un sérum est déterminé par l'agglutination lente d'une suspension de *Brucella* inactivée par le formol et la chaleur. L'antigène utilisé pour cette réaction d'agglutination en tubes est standardisé avec un sérum de l'O.M.S. (sérum anti abortus) ce qui permet d'exprimer les résultats en unités internationales par millilitre (UI/mL).

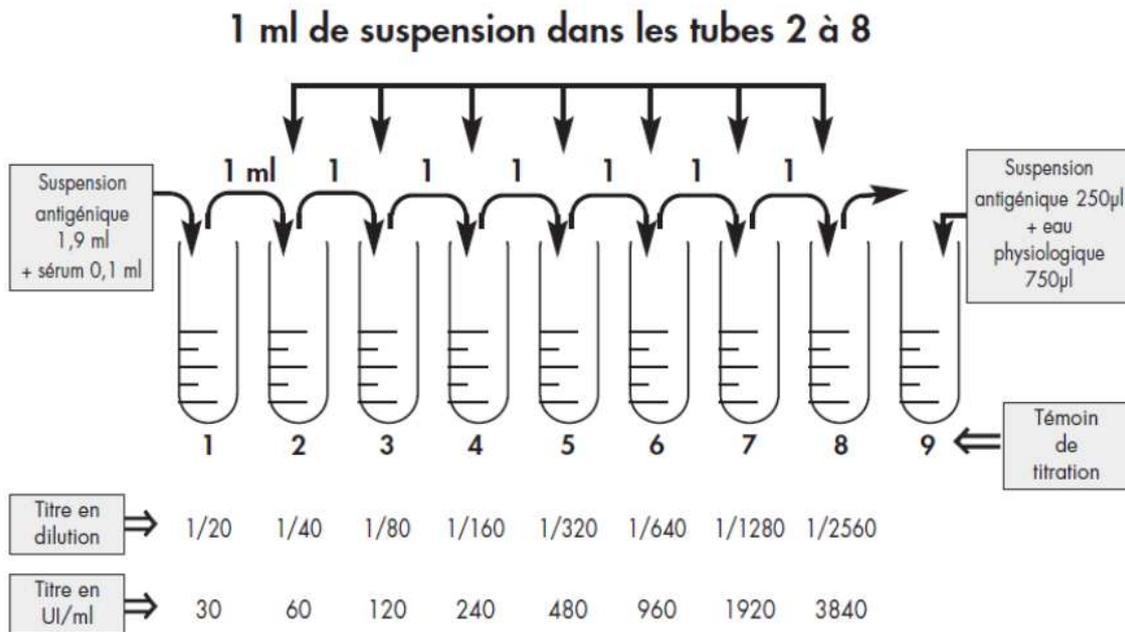


**Photo 2.** Antigène brucellique (sérum anti-abortus)

• Mode opératoire :

- Placer l'antigène et les sérums à température ambiante (18-23°C), 30 à 60 minutes avant le début du test.
- Diluer les sérums à tester au 1/5 (par exemple : 0,5 mL de sérum + 2 mL d'une solution de NaCl à 9 g/L).

- Pour chaque série : préparer un témoin 50% agglutination (tube n°10) et la galerie de tubes suivants en mL:



- -Agiter chaque tube et incuber 24 heures à l'étuve à 37°C.



**Figure 9.** La galerie des tubes (S.A.W) avant incubation. URL6

#### 4.2. Diagnostic direct de la brucellose au laboratoire

Le diagnostic à la phase aiguë est établi par hémocultures : trois hémocultures doivent être réalisées le plus près possible du début des manifestations cliniques est avant la prise d'un antibiotique.

Des prélèvements différentes, à quelques heures d'intervalle, effectués au moment d'un pic d'hyperthermie ou hypothermie ou lors de frissons qui signent une décharge bactériémie.

Les cultures de *Brucella* doivent être réalisées au laboratoire de sécurité biologique de niveau 3 .(PSM : Poste de sécurité microbiologique)



**Photo 3.** Prélèvements hémocultures

- Mode opératoire :
  - Les flacons incubés à l'étuve pendant 08 jours
  - Prélever à l'aide d'une seringue un volume de sang après désinfection du bouchon d'hémocultures
  - Déposer une goutte de sang dans des milieux gélosés
  - Ensemencer par strie la goutte de sang sur le milieu gélosé.
  - Incuber sous CO<sub>2</sub> les boîtes de Petrie à 37°C pendant 48 heures

Repiquer plusieurs semaines systématiquement

- ❖ L'examen de culture se fait chaque jour, si l'hémoculture reste négative pendant les premiers jours d'incubation, on va la conserver pendant 21 jours à 1 mois. La culture se traduit par un trouble homogène de milieu liquide avec un viol à la surface.

## 5. L'enrichissement

L'enrichissement du nombre de bactéries est réalisé en ensemençant chaque échantillon dans la gélose nutritive et laisser incubé 24h à 37°C.

## 6. Isolement et purification

Après incubation des deux milieux sélectifs ensemençés, les colonies bactériennes ont été purifiées par ré-isolement sur les mêmes milieux sélectifs afin d'obtenir des souches pures pour entamer l'identification. Les colonies sont repérées selon leurs aspects et leurs morphologies.

## 7. Identification

L'identification comporte une série d'étape, se succédant dans un ordre déterminé. Les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards (la coloration de Gram, catalase et test d'oxydase) et par le système API 20NE pour les souches d'*E. coli*.

Les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

### 7.1. Caractère macroscopique

L'étude des caractères visibles à l'œil nu : formes, taille, couleur et aspect des colonies.

### 7.2. Caractère microscopique

C'est l'étude la mobilité et de la coloration de Gram.

### 7.3. Recherche de la catalase

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (Garnier et Denis, 2007). A partir d'un isolement, une petite quantité de culture bactérienne est prélevée; puis placée sur une lame, et on fait réagir la colonie dans 1 goutte de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

Une réaction positive se traduit par le dégagement de bulles de gaz (oxygène), la réaction se fait selon l'équation suivante :



Ce test, peut être réalisé en tube contenant 0,5 mL de  $H_2O_2$ . Les colonies sont prélevées et introduites dans le tube. Le résultat est identique à celui obtenu lors du test sur lame (Aouati, 2009; Chaala, 2013).

### 7.4. Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus discriminatifs et les plus employés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif. Cette technique consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée semi quinonique rose violacé.

L'oxydase (ou cytochrome oxydase) est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons.

Les bactéries qui possèdent l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N,N,N,N-tétraméthyl- 1,4-phénylène diamine qui est un composant du réactif de la recherche du cytochrome oxydase en bactériologie, ce qui donne des produits violacés.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes (la réaction peut être tardive entre 10 et 60 secondes), et elle est négative après 60 secondes.

### 7.5. Identification par la galerie API 20E

Principe :

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. Ce système comporte 20 cupules tests qui contiennent un milieu réactionnel déshydraté.

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

Techniques :

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale.

Préparation de l'inoculum

- Une colonie est prélevée sur un milieu gélosé et en suite mise dans un tube de 5 mL d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une suspension bactérienne.

Incubation de la galerie :

- homogénéiser la suspension bactérienne.
- Pour les tests CIP, VP, GEL remplir les tubes et les cupules.
- Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes.
- Recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H<sub>2</sub>S, URE avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Mettre le couvercle de la galerie.
- Incuber à 35-37 °C pendant 18 à 24 h.

Lecture et interprétation :

L'interprétation de la galerie s'effectue après incubation, en se référant au tableau de lecture (Voir annexe).

## 8. Antibiogramme

C'est la Recherche, de la sensibilité d'une souche bactérienne aux antibiotiques et exprimer le résultat de façon utile pour le clinicien en termes de sensibilité ou de résistance vis à vis des résultats cliniques attendus.

Technique:

- ✓ Ensemencé par une culture pure de la souche étudiée à la surface d'un milieu de culture gélosé.
- ✓ Déposer les disques d'ATB à tester.
- ✓ Après incubation, mesurer les zones d'inhibition (la résistance se traduit par l'absence des zones d'inhibition).

## 9. Conservation des souches

Les souches bactériennes sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinés à une température de 4°C (ces bactéries sont placées dans un état de vie ralentie ou momentanément suspendue donc dans des conditions peu (ou pas) favorables pour leur multiplication).

# Résultats et discussion

## 1. Diagnostic indirect de la brucellose au laboratoire

### a) L'épreuve à l'antigène tamponné au Rose Bengale (EAT au RB)

L'agglutination se produit après 4 minutes d'agitation, et il est possible d'apprécier à l'œil nu sous un bon éclairage l'agglutination ; qui doit être confirmée par des témoins (témoin positif et un témoin négatif).

- la présence d'agglutination même minime révèle la présence d'anticorps brucellique (c'est-à-dire sérum positif).
- Pas d'agglutination signifie un sérum négatif.



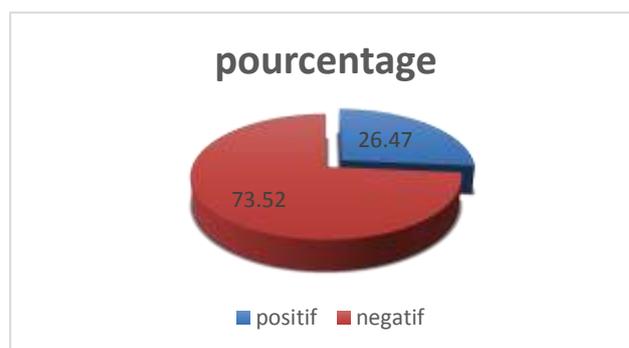
**Photo 4.** Le phénomène d'agglutination.      **Figure10.** Résultats de RB.

- Les résultats obtenus par le test 'EAT au RB' sont montrés dans le tableau suivant :

**Tableau 8.** Résultats du test 'EAT au RB

Echantillons	Nombre	Pourcentage
<b>Positif</b>	18	26,47%
<b>Négatif</b>	50	73,52%
<b>Total</b>	68	100%

Durant notre période de stage (du janvier au mars 2017): 86 patients suspectés de brucellose ont été prélevés au niveau du laboratoire de l'EPH Dr. Tirichine Brahim, et parmi ces patients, nous avons signalé que 18 cas ont été confirmés, c'est-à-dire Wright positif, ce qui représente 26,47%.

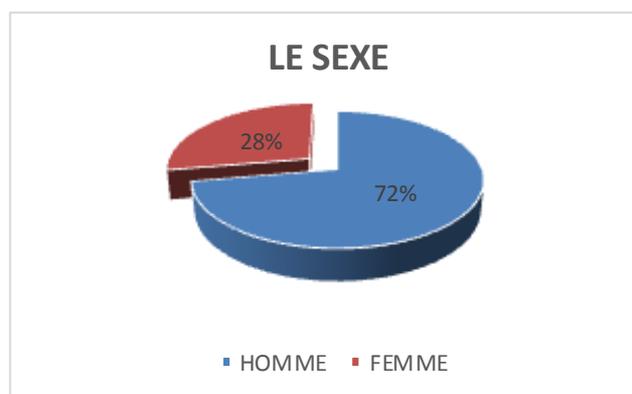


**Figure 11.** Pourcentage de cas positif

Le résultat de la répartition de la brucellose selon le sexe des patients montre que le sexe le plus atteint par la brucellose est le sexe masculin et qui représente le taux le plus élevé avec 13 cas (ce qui représente un pourcentage de 72,22%), contre uniquement 5 cas chez le sexe féminin, comme présenté dans le Tableau suivant.

**Tableau 9.** Les résultats positifs selon le sexe.

Le Sexe	Nombre	Pourcentage %
Homme	13	72,22
Femme	05	27,77
Total	18	100



**Figure 12.** Pourcentage des tests positifs selon le sexe.

Le diagnostic indirect de la brucellose est une technique qualitative d'agglutination active directe sur lame, obtenue en mélangeant une goutte de sérum du patient et une goutte d'Ag (*Brucella abortus*, inactivée par la chaleur et les antibiotiques phénolées) coloré au Rose Bengal (dérivé de la fluorescéine).

Il s'agit d'une méthode rapide, peu couteuse et demeure la méthode de référence pour le diagnostic sérologique du brucellose humaine au niveau des établissements sanitaires étatiques et également chez les cliniques privés.

L'utilisation de ce test sérologique est recommandée pour confirmer la suspicion clinique, et également pour suivre l'évolution d'une infection brucellique et diagnostiquer les rechutes. C'est un moyen simple et facile qui permet la détection d'anticorps à partir des stades avancés de la maladie. Cette méthode permet la détection, en une seule étape des anticorps agglutinants IgM et IgG.

La diminution rapide des titres en anticorps associées à l'amélioration de la condition clinique du patient constituent un bon indicateur qui témoigne d'une évolution favorable vers la guérison. Il est spécialement conçu et largement utilisé pour le diagnostic de la brucellose chronique et le suivi du traitement par les antibiotiques adéquats.

#### b) Sérodiagnostic de Wright en tubes (S.A.W)

Après uniquement 24 h d'incubation à 37°C, il est possible d'apprécier les résultats de cette technique à l'œil nu.

Lorsque le sérum est positif, il se forme des complexes antigène/anticorps qui précipitent en formant un culot, tandis que le surnageant devient transparent. En revanche, lorsque le mélange réactionnel reste opaque (sans agrégats au cours de l'agitation), le sérum est négatif.



**Photo 5.** Résultats positifs de S.A.W

Résultat négatif

❖ Le titre du sérum est donné par la dernière dilution encore positive (voir Photo 5).

**Tableau 10.** Les résultats de sérodiagnostic de Wright durant (du janvier au mars 2017).

Dilution	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	Total
<b>Titre UI/mL</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>480</b>	<b>960</b>	<b>1920</b>	<b>3840</b>	
<b>Nombre</b>	<b>00</b>	<b>02</b>	<b>05</b>	<b>02</b>	<b>01</b>	<b>03</b>	<b>03</b>	<b>02</b>	<b>18</b>
<b>Taux%</b>	<b>00</b>	<b>11%</b>	<b>28%</b>	<b>11%</b>	<b>5%</b>	<b>16%</b>	<b>16%</b>	<b>11%</b>	<b>100%</b>

- ❖ Un titre plus faible (30 ou 60 UI/mL) indique une brucellose ancienne en déclin ou le début d'une infection. Confirmer le diagnostic en réalisant un 2<sup>ème</sup> test 15 jours plus tard.
- ❖ Un titre supérieur ou égal à 120 UI/mL indique une brucellose récente et active.

#### Interprétation:

Il est indispensable de tester tous les sérums positifs de façons quantitatives par la séro-agglutination de Wright (SAW) car ce teste se positive avant l'épreuve à l'antigène tamponné de quelque jours. Il détecte des immunoglobulines de la classe des IgM, tandis que la détection d'IgG spécifique est un bon marqueur d'une infection active.

La technique de sérodiagnostic de Wright est très sensible (25UI/mL), spécifique et reste positive longtemps (en moyenne 7 à15 jours après le début des signes cliniques), car elle met en évidence des IgM et IgG (Patrick *et al.*, 1991). En revanche, le phénomène devient assez rapidement négatif en cas de guérison. Le taux minimal significatif est 1/80 (120UI/mL).

La persistance d'un titre d'anticorps supérieur ou égal à 1/80 un an après le début clinique doit faire penser à un possible foyer profond.

La présence d'anticorps monovalents dit bloquants peut donner une réaction faussement négative. A l'inverse, une réaction faussement positive (fausses agglutinations), dues à des antigènes communs aux brucelles et à d'autres bactéries à un titre faible ou moyen est possible après une vaccination anticholérique, une yersiniose à *Yersinia enterocolitica*, une infection à *Escherichia coli*. De même, chez un ancien malade apparemment guéri (Patrick *et al.*, 1991).

## 2. Diagnostic direct de la brucellose au laboratoire

Le diagnostic direct de la brucellose, c'est-à-dire les hémocultures, a une sensibilité relativement basse, et nécessite plusieurs semaines d'incubation pour l'examen macroscopique des flacons d'hémocultures.

Tout d'abord, le prélèvement reçu (les flacons d'hémocultures) sont incubés à 37°C dans l'étuve pendant 48 à 72 heures, est soumis par la suite à l'examen macroscopique qui permettra de noter les modifications de l'aspect.

Pour nos trois échantillons, les flacons sont inspectés en vue de rechercher des signes témoignant d'une croissance visible, mais aucune modification n'a été constatée de l'aspect d'hémocultures (aucun trouble observé).

Les résultats de repiquage systématique du flacon sur gélose pendant plusieurs semaines sont négatives car on obtient une culture stérile à chaque fois.

Selon ces résultats, on ne peut pas confirmer l'identification de la bactérie recherchée, et donc on ne peut pas d'affirmer le diagnostic bactériologique.

L'isolement de *Brucella* en culture demeure la technique de référence pour établir un diagnostic de certitude. Devant une suspicion de brucellose, le laboratoire doit être averti de la demande de mise en culture des produits pathologiques du fait de certaines exigences de la bactérie, comme l'utilisation de milieux enrichis au sang, la température optimale de 34 à 37°C, l'atmosphère enrichie à 10% de CO<sub>2</sub> pour *B. abortus*, le temps d'observation prolongé des cultures, et surtout du risque élevé de contamination du personnel. Les cultures de *Brucella* doivent être réalisées en laboratoire de sécurité biologique de niveau 3.

Le pourcentage d'hémoculture positive est élevé durant la présentation aiguë en phase septicémique. Il diminue dans les formes localisées et la culture est exceptionnellement positive durant la phase chronique. La culture devrait être réalisée dans les 15 jours qui suivent l'apparition des symptômes cliniques. Par la suite, sa sensibilité diminue fortement, notamment si le patient a été mis sous traitement antibiotique.

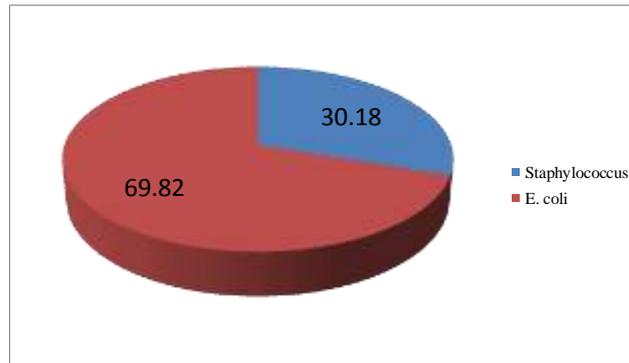
### 3. Test bactériologique des souches isolées

Un total de 53 souches de différents prélèvements liquides (urines, sang) ont été isolées et identifiées.

37 souches *E. coli* et 16 souches de *S. aureus*.

**Tableau 11.** Représentation des cas.

	Nombres	Pourcentage %
<i>E. coli</i>	37	69.82
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	30.18
Totale	53	100



**Figure 13.** Pourcentage de prélèvement positif à *E. coli* et *S. aureus*.

Les 53 souches ayant été isolées à partir de cultures positives ont permis d'assigner 16 souches à l'espèce *Staphylococcus aureus* et 37 souches d'*E. coli*.

#### a. Identification des souches isolées

##### 1. Etude macroscopique

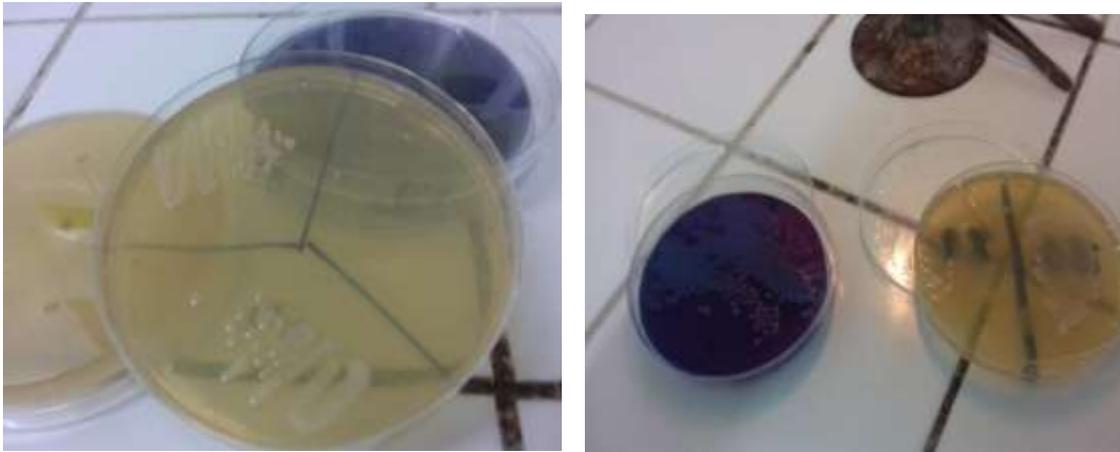
Sur le milieu de Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques des souches de *Staphylococcus aureus*. Sur ce milieu, les colonies de cette espèce sont apparues souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune (dans le cas où le mannitol est fermenté), si non les colonies sont de couleur blanche. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre après 48h d'incubation à 37°.



**Photo 6.** Aspect macroscopique des *Staphylococcus aureus*.

Sur les milieux de culture : GN (gélose nutritive), milieu B.C.P. ou milieu Mac Conkey, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristiques des souches d'*E. coli*. Sur ces trois

milieux de culture, les colonies sont arrondies à bords régulier de 1-3 mm de diamètre (après 48h d'incubation à 37°) et de couleur blanchâtres a blanche-grisâtres.



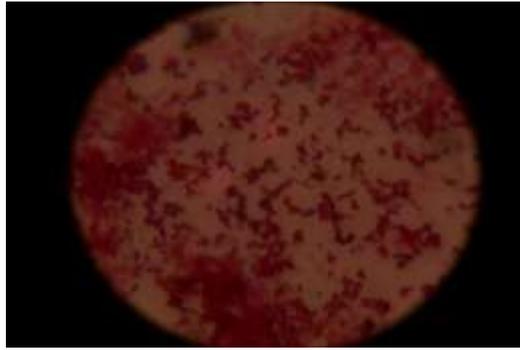
**Photo 7.** Aspect de souches d'*E coli* sur deux milieux de culture , B.C.P (couleur foncé) et GN (couleur claire).



**Photo 8.** Aspect macroscopique des colonies de *E. coli* sur Mac Conkey.

## 2. Etude microscopique et coloration de Gram

La coloration de Gram (coloration différentielle) a été effectuée pour les 53 souches isolées. Les cocci sphériques non sporulés, en grappe de raisin ou en paires ont été colorés en violet (Photo9) qui indique qu'il s'agit de bactéries à Gram positif. Ce résultat affirme que ces bactéries appartiennent au genre *Staphylococcus*.



**Photo 9.** Coloration de Gram négatif sous microscope (G  $\times$ 100).

En revanche, les fins bacilles incurvés non sporulés ont été coloré souvent en couleur rose qui montre qu'il s'agit de bactéries à Gram négatif. Cette constatations confirme que ces bactéries appartiennent au genre *Escherichia*.

### 3. Identification biochimique

#### 3.1. Test de la catalase

Toutes les bactéries isolées ont été testées pour la production de la catalase. Le résultat obtenu montre que toutes les souches ont décomposées l'eau oxygénée en eau et en oxygène (qui se dégage). Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (Photo 10).



**Photo 9.** Production de la catalase par les souches isolées (dégagement des bulles de gaz).

Les résultats obtenus affirment l'identification des bactéries isolées en deux genres distincts (*Staphylococcus* et *Escherichia*).

### 3.2. Test d'oxydase :

Le test oxydase a été réalisé pour les souches isolées. Le résultat montre qu'il n'y a pas eu de coloration.



**Photo 11.** Mise en évidence d'absence d'oxydase par les souches analysées (*E coli* et *S. aureus*).

Il est à signaler que les deux espèces : *Staphylococcus aureus* et *E. coli* sont dépourvues d'oxydase, donc elles sont oxydase négative.

### 3.3. Test de la coagulasse

Le test de la production de l'enzyme coagulasse a été réalisé pour les souches bactériennes isolées. Le résultat obtenu montre que toutes les souches de *staphylococcus aureus* possèdent cette enzyme (coagulasse positif). En revanche, aucune souche d'*E. coli* n'est capable de synthétiser cette enzyme.



**Photo12.** Coagulasse positif chez les souches de *Staphylococcus aureus*.

### 3.4. Identification biochimique par le système miniaturisé API 20

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20E nous a permis de confirmer l'identification des souches d'*E. coli* et de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de ces souches (photo 9).



**Photo 12.** Identification d'*E. coli* par la galerie API 20.

**Tableau 12.** Résultat des Tests biochimiques d'*E.coli*.

TEST	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
RESULTATS	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

L'espèce *E. coli* est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunodéprimés ou affaiblis, ce qui pose un problème de traitement des patients touchés par ces infections.

En Algérie, *E. coli* est le premier agent le plus incriminé dans les infections associées aux soins (Benslimani et Meieddine, 2012; Amrouni *et al.*, 2014). Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, montre que cette souche occupe la première place juste après en trouve la *Staphylococcus aureus* dans les infections nosocomiales (Amazian *et al.*, 2010).

*E. coli* est à l'origine des infections urinaires nosocomiales, elle est responsable d'infections nosocomiales sévères.

L'identification de chaque souche est établie dans un profile bien déterminé. *Staphylococcus aureus* c'est aussi un agent commensal de la peau et des muqueuses de l'homme. Il présente le

potentiel de pathogénicité le plus important de toutes les espèces du genre *Staphylococcus*. Ce germe est responsable d'infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer à des dispositifs médicaux (Liesse Iyamba, 2012).

### b. Antibiogramme

Le résultat obtenu de l'antibiogramme est présenté dans la photo 13.



**Photo 14.** Antibiogramme d'*E. coli*.

Les résultats obtenus des antibiogrammes des différentes souches isolées sont montrés dans le tableau 13.

**Tableau 13.** La sensibilité d'*E. coli* aux ATB.

Antibiotiques	Signe	Charge µg	Zone 'inhibition	Résultats
Ampicilline	Amp	10	08	Résistance
Amikacine	AK	30	20	Sensible
Céfotétan	COT	25	28	Sensible
Cefotaxime	CTX	30	30	Sensible
Nitroxoline	NTX	100	26	Sensible
Amoxicilline	AMC	30	22	Sensible

## Discussion

La souche d'*E. coli* isolée à partir des urines d'un malade montre que cette souche a une sensibilité à différentes ATB; par contre, elle a une résistance à l'ampicilline qui appartient à la famille des  $\beta$ -lactamines et plus précisément aux pénicillines à large spectre d'action, elle présente donc une simple résistance.



**Photo 15.** Antibiogramme de *Staphylococcus*.

Les résultats d'Antibiogramme d'une souche de staphylococcus aureus présente dans le tableau 14.

**Tableau 14.** Résultats d'antibiogramme de staphylococcus aureus

Antibiotiques	Signe	Charge $\mu\text{g}$	Zone d'inhibition mm	Sensibilités
Fosfomycine	FO	200	26	Sensible
Rifamycine	RIF	30	35	Sensible
Clindamycine	DA	30	28	Sensible
Vancomycine	VA	30	24	Sensible
Rifampicine	RP	15	38	Sensible
Amikacine	AK	30	6	Résistant
Neomycine	N	30	2	Résistant
Kanamycine	K	30	00	Résistant

La Rifamicine a une zone d'inhibition plus importante (35 mm) par rapport au d'autres ATB, et même pour l'ATB de la même famille rifampicine (38 mm),

les ATB : amikacine, kanamicine, de la famille des aminosides ont une résistance remarquable, même pour l'ATB neomycine qui appartenant à la famille des Macrolides à une résistance par la *Staphylococcus aureus*,

Un antibiotique appartenant à la famille des glycopeptides la vancomycine qui a un spectre étroit : Gram+ et qui est utilisé dans les traitements des infections dues aux Staphylococcus (Naoki, 1999).

# Conclusion

L'analyse bactériologique classique des prélèvements avec examen microscopique, mise en culture et identification constitue la majorité des analyses bactériologiques réalisées au laboratoire.

Néanmoins, cette démarche demande plusieurs jours et pour certaines infections graves nécessitant la mise en route rapide d'un traitement antibiotique, l'identification rapide de la bactérie responsable présente un intérêt majeur. De même, pour certaines bactéries de croissance difficile, les tests rapides constituent un moyen de diagnostic particulièrement intéressant.

Notre travail a permis d'évaluer les moyens de diagnostiquer une infection bactérienne due à la présence de *Brucella*, de *S. aureus* et d'*E. coli*.

- ✓ Le diagnostic de certitude de la brucellose demeure fondé sur l'isolement en culture des *Brucella*. La négativité des hémocultures ne nous a pas permis d'établir un diagnostic direct. Les *Brucella* sont des germes nutritionnellement exigeants et à culture lente. L'utilisation de milieux sélectifs est donc indispensable.

Les méthodes de sérodiagnostic de *Brucella* par la réaction à l'antigène tamponné ou test au Rose Bengale est un excellent test de dépistage. C'est une réaction qualitative simple, rapide, sensible, qui reste pendant longtemps positive.

- ✓ Le diagnostic bactériologique de l'infection staphylococcique est uniquement direct (mise en évidence de la bactérie). Il n'y a pas de diagnostic indirect par recherche des anticorps circulants. *S. aureus* est cultivé facilement sur les milieux usuels, à des conditions de pH et de température variables. Il est même capable de pousser dans des conditions hostiles, par exemple en présence de 7 % de NaCl. Ce caractère est mis à profit dans le milieu de culture sélectif hyper salé de Chapman pour isoler le staphylocoque d'un prélèvement poly microbien.
- ✓ Le diagnostic bactériologique dans les infections urinaires due aux *E. coli*, repose sur la mise en évidence à l'examen microscopique d'une réaction cellulaire de défense contre l'infection (présence de polynucléaires) et en culture d'un nombre élevé d'*E. coli*.

Le diagnostic est fait selon les procédés habituels : prélèvements aseptiques, examen microscopique à la recherche d'une réaction inflammatoire et de bacilles à Gram négatif, culture, identification et antibiogramme.

Les résultats de cette étude sont conclus en points suivants :

Toutes les bactéries ne possèdent pas les mêmes exigences de culture. Il existe ainsi des milieux de base permettant la croissance de bactéries peu exigeantes et des milieux enrichis en différentes

substances (vitamines, sang, œuf, etc.) permettant la croissance d'espèces bactériennes plus exigeante

Les hémocultures ont une sensibilité basse et nécessitent plusieurs semaines d'incubation d'où l'importance des tests sérologiques.

Les techniques rapides en bactériologie (antigénique et moléculaire) constituent un outil diagnostique intéressant et performant. Elles devraient donc encore se développer dans les prochaines années. Cependant, ces techniques restent limitées sur un certain nombre de points :

- les performances (sensibilité et spécificité) sont variables d'un test à l'autre. Elle nécessite l'utilisation de plusieurs techniques, et pose le problème essentiel de son manque de spécificité lié à la fréquence des faux positifs par réactions sérologiques croisées.
- la recherche des Ig ne constitue qu'un diagnostic d'orientation complémentaire.
- ces techniques ne permettent pas d'obtenir la souche bactérienne et donc de réaliser un antibiogramme si besoin. Dans un certain nombre de cas, il faudra mettre en œuvre en parallèle une démarche bactériologique classique avec mise en culture des prélèvements.

Les recommandations pour un meilleur diagnostic qui découlent de notre étude s'articulent autour de 2 axes :

- L'amélioration du diagnostic directe, ainsi une référence en termes de spécificité, de sensibilité, d'efficacité et de rapidité.
- La PCR est apparue comme des techniques sensibles et spécifiques, particulièrement utiles dans le cas où l'administration d'une antibiothérapie empirique empêche l'isolement de *Brucella* (François, 2011).

# Références Bibliographiques

- ABADANE, Z.2014.** Séroprévalence et facteurs de risque de la brucellose chez les professionnels des abattoirs de la région du Grand Casablanca, Mémoire de fin d'études ;2-8 p
- Amazian,K., Rossello,J., Castella,A., Sekkat,S., Terzaki,S., Dhidah,L. et al. (2010)** [Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region].  
*East Mediterr Health J* **16**: 1070-1078.
- ANSES** : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail .
- Archambaud Maryse Danielle CLAVE** DCEM 1 (2008) Laboratoire de Bactériologie-Hygiène Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil p 32/ 37
- Aouati, H. (2009).** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistances à la méthécillines: etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Département De Biochimie et De Microbiologie, algérie: thèse N° : 006 / SN / 2009.
- Avril, J. François, D. (2000).** bactériologie clinique.p585.
- Anonyme,** Etude sur les brucelloses humaines en France métropolitaine, 2002 - 2004Institut de veille sanitaire (INVS) ; Département des maladies infectieuses : Dépôt légal : Janvier 2007; Imprimé par FRANCE REPRO - Maisons-Alfort, 12, rue du Val d'Osne - 94415 Saint-Maurice cedex : <http://www.invs.sante.fr>.
- Bernard, L. 2006.** Mécanismes physiopathologiques des infections orthopédiques. *Rev. Rhumatol.*73: 327-331.
- Benslimani A., Meieddine C., (2012).** État de la résistance aux antibiotiques, d'autres espèces bactériennes et surveillance des bactéries multirésistantes (BMR) : SARM, entérobactéries BLSE, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine. In: Réseaux algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques (ed) 13<sup>e</sup> rapport d'évaluation, pp. 65–88.
- BIOKAR(2009).**Gélose de Mac Conkey.[www.solabia.com](http://www.solabia.com)
- BIO-RAD. (2007)** Chapman – mannitol saït agar.[www.af-nor-validation.org](http://www.af-nor-validation.org)  
(DSP)ghardaia: algérie presse service. avril 2016
- Chakroun, M., bouzouaia, N. (2007).** la brucellose : une zoonose toujours d'actualité brucellosis : atypical zoonosis avril 07, vol 1, n°2, 1 - 10  
service des maladies infectieuses. Eps fattouma bourguiba – monastir
- Chaalal, W. (2013).** Occurrence et profil d'antibio résistance des *Staphylococcus aureus* isolée de produits alimentaires. université"Es-senia Oran, Algérie.
- Couture B. (1990).** Bactériologie médicale «Etude et méthodes d'identification des bactéries

aérobies et facultatives d'intérêt médical». Vigot, Paris. 15-32.

**Clotilde, M. (2006).** Contribution à l'étude épidémiologique de la brucellose dans la province de l'Arkhangai (Mongolie), thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire ; l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE.

**Debernat H., Avril J.L., Denis F. et Monteil H.** (Bactériologie clinique 2<sup>ème</sup> édition , 1992) [www.biblio-scientifique.net](http://www.biblio-scientifique.net).

**El Kouir, D. (2003).** Infections à staphylocoques : aspects cliniques et bactériologiques. *EMC, maladies infectieuses* , [8-007-A-10].

**Farmer** *Enterobacteriaceae* : Introduction and identification In : Manual of clinical Microbiology, P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, Tenover F.C. and R.H. Tenover (eds) 7<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999 : 442-458.

**Fauchère, J.L. and Avril J.L. (2002).** Bactériologie générale et médicale. ellipses, Paris. 213-217.

**Fauchère, J.L. (1990).** Bactériologie –Fiches. Édition. Marketing.Paris. Chapitre 6 p72- 75

**Ferron, A. (1984).** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12<sup>ème</sup> édition. CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.

**Foster, T. (1996).** *Staphylococcus*. In: S. Baron, Editor. *Medical Microbiology*.4<sup>th</sup> édition.

**freycon, P., (2015).** *role du bouquetin capra ibex dans l'épidémiologie de la brucellose a brucella melitensis en haute sa voie* thèse d'état de doctorat présentée à l'université claudes-bernaud - lyoni(médecine - pharmacie): 31p

**François, D., Marie-Cécile, P., Christian, M., Édouard, B. Roland, Q. (2011)** : Bactériologie médicale. Techniques usuelles. Paris, Elsevier Masson SAS : 2<sup>ème</sup> éd; 2/ ; p20. p280.

Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.

**Garnier F, Denis F. (2007).**Bactériologie médicale : Techniques usuelles : Cocci à Gram Positif. Masson. Chapitre 29 .251, 254.

**Harris, L. G. et R. G. Richards. (2006).** Staphylococci and implants surfaces: a review. *Injury, Int. J. Care Injured* 37: S3-S14.

**Liesse Iyamba J M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat : Université libre de Bruxelles, Faculté de Pharmacie, Ecole Doctorale en Sciences Pharmaceutiques. 226p.

**Maurin, M. Brion, J. (2009).** Brucellose emc (Elsevier Masson SAS. Paris), Maladies infectieuses,

**Maurin, M. (2005).** La brucellose à l'aube du 21<sup>e</sup> siècle. Médecine et maladies infectieuses, Revue générale récente; 35: 6–16.

- Sow Ibrahim, M., (2011).** evaluation du risque de brucellose lie à la consommation du lait frais dans la commune rurale de cinzana.
- Naoki, M. Toshio, T., Masato, M., Naoko, k., yoshiko, H., Hironobu, I., Tsutomu, S., Masa, H. and Tomio, T., (1999).** lactonamycin, a new antimicrobial antibiotic produced by *strptomycetesrishiriensis* mj 773-88k4. The journal of antibiotics. vol. 52: pp 269-275.
- Patrick, B. Jean, LG. Michel, S, (1992).** bactériologie: les bactéries des infections humaines, éd ; Médecine/ Sciences. Flammarion, France, 189-199 p.
- Jones, K., Patel, N., Levy, M., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J., Daszak, P. (2008).** Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Kurlenda, J. et M. Grinholc. (2012).** Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. *ActaBiochim.Pol.* 59:171-184.
- Kloos, W.E. and Veron, M. (1990).**Bactériologie Médicale «*Staphylococcus* et *Micrococcus*»J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773-794.
- Rhyan, J. Spraker, T. (2010).**Emergence of diseasesfromwildlifereservoirs.*VeterinaryPathology Online*, 47(1), 34-39.
- URL1: <http://www.bacterio.net/b/brucella.html>.
- URL2:<http://www.futura-sciences.com/fr/news/t/medecine/>

# Annexes

**Annexe 01 : Milieux de culture****Milieu de Chapman****Composition:**

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g
pH=7,6	

**1. Gélose nutritive pour la conservation****Composition :**

Peptone.....	10.0g
Extrait de viande.....	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar.....	10.0g
pH=7.3	

**2. milieu Mac Conkey**

**COMPOSITION:** en grammes par litre d'eau distillée

Peptone de caséine.....	17
Peptone de viande.....	3
Sels biliaires.....	1,5
Cristal violet.....	0,001
Lactose.....	10
Rouge neutre.....	0,03
NaCl.....	5
Agar.....	13,5

pH final = 7,1

### 3. BCP

Dans un volume final d'un litre:

Peptone : 5,0 g

Extrait de viande de bœuf : 3,0 g

Lactose : 10,0 g

Pourpre de bromocrésol : 25 mg

Agar : 15 g

(pH = 6,8)

### 4. Bouillon coeur-cervele (BHIB)

#### Composition :

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de coeur de boeuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g
Phosphatase di sodique.....	5g

pH= 7.4

**Préparation** : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min.

-

## ANNEXE 2. Fiche et Tableaux

## - Fiche de résultat du système API 20 E

		CE 07223 C	REF : _____ / ____ / ____																										
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :																											
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
ONPG	ADH	LDC	ODC	LCIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	LVP	LGEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	NO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	MOB	McC	OF-0	OF-F			
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :												Ident. / Ταυτοποίηση :																	

**Figure** .fiche de résultat du système API 20E.

**Tableau.** Tableau de lecture du système API 20E

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside	0,223	β-galactosidase (Ortho NitroPhényl-β-D-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune (1)
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	jaune	rouge / orangé (2)
LDC	L-lysine	1,9	Lysine DeCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
ODC	L-ornithine	1,9	Ornithine DeCarboxylase	jaune	rouge / orangé (2)
[CIT]	trisodium citrate	0,756	utilisation du Citrate	vert pâle / jaune	bleu-vert / bleu (3)
H <sub>2</sub> S	sodium thiosulfate	0,075	production d'H <sub>2</sub> S	incoloré / grisâtre	dépôt noir / fin liseré
URE	urée	0,76	UREase	jaune	rouge / orangé (2)
TDA	L-tryptophane	0,38	Tryptophane DésAminase	jaune	TDA / immédiat marron-rougeâtre
IND	L-tryptophane	0,19	production d'INDole	incoloré vert pâle / jaune	JAMES / immédiat rose
[VP]	sodium pyruvate	1,9	production d'acétolne (Voges Proskauer)	incoloré	VP 1 + VP 2 / 10 min rose / rouge (5)
[GEL]	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)	

des nitrates tube GLU	potassium nitrate	0,075	production de NO <sub>2</sub> réduction au stade Nz	jaune	rouge
				Zn / 5 min	
				orange-rouge	jaune
MOB	API M Medium ou microscope		mobilité	immobile	mobile
McC	milieu de MacConkey		culture	absence	présence
OF-F OF-O	glucose (API OF Medium)		fermentation : sous huile oxydation : à l'air	vert	jaune jaune

### ANNEXE 3 : Composition des Réactifs

#### 1. Réactifs de la coloration de Gram Violet de gentiane:

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

#### Lugol:

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée .....	300 ml

#### Alcool (éthanol)

#### Fuschine de ziehl:

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée .....	100

#### 2. Composition des réactifs utilisés lors de la lecture du système API 20E

##### -Réactifs utilisés :

##### Réactif VP1 :

-Hydroxyde de potassium.....	40g
-H <sub>2</sub> O.....	100ml

##### Réactif VP2 :

- $\alpha$ -naphthol.....	6g
-Ethanol.....	100ml

##### Réactif de covax:

-p-diméthylamino-benzaldéhyde .....	5,00 g
-Alcool iso-amylque.....	75 ml
-Acide chlorhydrique pur.....	25 ml