

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département De Microbiologie Spécialité de Biotechnologie et Santé



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER

Thème

**Bactériologie des abcès et des suppurations
profondes : places des Bactéries Anaérobies strictes**

Présenté par :

MADDI Lydia & TAOURIRT Tinhinane

Soutenu le 10 Septembre 2023

Devant le jury composé de :

Mme. ARKOUB Warda	MCA, Université de Béjaïa	Président
Mme. ADJEROUD Nawel	MCA, Université de Béjaïa	Encadreur
Mme. BOUCHERIH Djahida	Pharmacienne Microbiologiste IPA, Alger	Co-encadreur
Mme. BOUDRIA Asma	MCA, Université de Béjaïa	Examineur

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous tenons à remercier avant tout Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide de Madame Tali-Maamar Hassiba, chef du laboratoire de Bactériologie Médicale et de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques de l'Institut Pasteur d'Alger qui nous a permis de réaliser notre stage, on la remercie aussi pour sa disponibilité.

Nous souhaitons exprimer notre profonde gratitude à Madame Boucherih Djahida, Pharmacienne Microbiologiste et Chargée de recherche au laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme de l'Institut Pasteur d'Alger. Sa direction et son encadrement pendant notre stage ont été inestimables. Son aide précieuse, son expertise et sa propension à demander le maximum à ses stagiaires nous ont énormément fait progresser, tant au niveau technique qu'au niveau professionnel.

Nos vifs remerciements à Mme Adjeroud Nawel, pour tous ses conseils judicieux, pour son orientation, sa disponibilité tout au long de la préparation de notre mémoire et pour ses encouragements continuels.

Nous sommes profondément reconnaissant envers tous le personnel du service Bactéries Anaérobies et du botulisme qui ont permis notre intégration, et plus particulièrement Monsieur Laichouchi et madame Betatache, merci énormément.

Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidés lors de la rédaction de notre mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon grand-père paternel décédé. Puisse Allah, le Tout-Puissant, l'accueillir en Sa sainte miséricorde et lui offrir le paradis comme dernière demeure.

A mes chers grands-parents, Messaad, Hamid et Fatima, merci pour les conseils que vous m'avez donnés, et pour la confiance et l'encouragement et l'affection que vous m'avez toujours portés.

A toi mon père Mohand Amokrane, mon bras droit, tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir, me protéger, me guider, me conseiller et m'encourager, que ce travail puisse être le résultat de tes sacrifices et que dieu te procure santé, bonheur et longue vie.

A ma très chère maman Sadjia, Autant de phrases aussi expressives soient elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Tu as toujours été présente à mes coté pour me consoler quand il le fallait. En ce jour mémorable pour moi et pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Que dieu te procure santé, bonheur et longue vie.

A mes deux frères Karim et Abdou et à ma petite sœur Meriem, merci pour votre amour et votre soutien. Je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur dans votre vie.

A mes chères tantes, Hakima, Khoukha, Assia, Nora, Nadjet, Kahina, Salima, Wissem.

A mes chers cousins : Moubarek, Linda, Asma, Razika, Lila, Yasmina.

A mes amies : Lilia, Amel, Hanane, Amina, Ferial avec qui j'ai partagé mes années d'étude et qui m'ont toujours soutenue et poussé vers l'avant.

A mes copines d'Alger Karima et Nawel merci énormément pour votre soutien et votre bienveillance.

Je vous aime très fort...

Fihinane

Dédicace

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je dédie ce modeste travail

*A mon très cher père **Rachid***

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi, Je t'aime fort. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Quisse Dieu Le Tout Puissant et Miséricordieux accorder au défunt Sa Sainte Miséricorde et l'accueillir en Son Vaste Paradis.

*A ma mère **Samia***

La plus belle créature que Dieu a créée sur terre, à cette source de tendresse, de patience et de générosité qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

*A mes **Sœurs** et mon **Frère***

Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

*A ma cousine **Lamia Boucherba***

Tu as toujours offert soutien et réconfort, J'exprime envers toi une profonde admiration, reconnaissance et attachements inconditionnels. Je te dis merci et je te souhaite bonheur, réussite et prospérité, je vous adresse mes meilleurs vœux de bonheur, de succès pour tes enfants.

*A mon beau-frère **Bilal Kara**, et mes oncles **Dada Fatah** et **Dada Akli***

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes nièces et mon neveu

*A ces petits démons **Amina**, **Amira**, **Mahmat** et **Dinaza** que Dieu nous a offerts, vous avez apporté beaucoup de bonheurs à notre famille. Je vous aime*

*A mes amies **Ikram**, **Hind**, **Amina**, **Dounia**, **Wissem**, **Saloua**, **Sahra Wafia** et **Karima** Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

DIA

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : ARN ribosomique

ATB : Antibiotique

BAS : Bactéries Anaérobies Strictes

EOS : Extremely Oxygen Sensitive

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

IPA : Institut Pasteur d'Alger

PCR : Polymerase Chain Reaction

PLP : Protéines de Liaison de la Pénicilline

TGY: Trypticase Glucose Yeast

VIIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

BGP: Bacille Gram Positif

BGN: Bacille Gram Négatif

CGP: Cocci Gram Positif

CGN: Cocci Gram Négatif

Liste des figures

Figure 1 : Milieu de transport Amies (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	17
Figure 2 : Flacon de gélose Columbia de 250ml prêt à l'emploi dans un bain marie (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	18
Figure 3 : Tube contenant 10 ml de sang de mouton (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	18
Figure 5 : Coulage du Falcon dans les boîtes de Pétri (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	19
Figure 4 : Addition du sang à la gélose Columbia (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	19
Figure 7 : Séchage des boîtes (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	19
Figure 6 : Technique d'élimination des bulles d'air. (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)	19
Figure 8 : Visualisation au microscope optique de <i>Actinomyces meyeri</i> après coloration de GRAM (Gr : X 1000)	22
Figure 9 : Visualisation au microscope optique de <i>Bacteroides fragilis</i> après coloration de GRAM (Gr : X 1000)	22
Figure 10 : Visualisation au microscope optique de <i>Propionibacterium acnes</i> après coloration de GRAM (Gr : X 1000)	22
Figure 11 : Visualisation au microscope optique de <i>Fusobacterium nucleatum</i> après coloration de GRAM (Gr : X 1000)	23
Figure 12 : Résultat de la galerie API® 20 A de <i>Propionibacterium acnes</i> (photographie prise à l'Institut Pasteur)	23
Figure 13 : Résultat de la galerie API® 20 A de <i>Bacteroides fragilis</i> (photographie prise à l'Institut Pasteur)	24
Figure 14 : résultat de la galerie API® 20 A de <i>Actinomyces meyeri</i> (photographie prise à l'Institut Pasteur)	24
Figure 15 : Résultats des antibiogrammes et des CMI de <i>Bacteroides fragilis</i> effectués au niveau de laboratoire des Bactéries Anaérobies et Botulisme de l'Institut Pasteur	25
Figure 16 : Résultats des antibiogrammes de <i>Propionibacterium acnes</i> effectués au niveau de laboratoire des Bactéries Anaérobies et Botulisme de l'Institut Pasteur	26
Figure 17 : Résultats des antibiogrammes de <i>Actinomyces meyeri</i> effectués au niveau de laboratoire des Bactéries Anaérobies et Botulisme de l'Institut Pasteur	26
Figure 18 : Secteur graphique représentant les pourcentages des prélèvements positifs et négatifs des infections anaérobies entre 2018 et 2023 ($n = 207$)	27
Figure 19 : Histogramme groupé du nombre des prélèvements analysés ainsi qu'au prélèvement positif en fonction des années entre 2018 et 2023 ($n = 207$)	28
Figure 20 : Barre groupée du nombre de prélèvements en fonction de leurs types ($n = 207$)	29
Figure 21 : Secteur graphique représentant la répartition des prélèvements négatifs en fonction de la prise préalable ou non de l'antibiotique ($n = 127$)	29
Figure 22 : Histogramme groupé du nombre de prélèvements positifs analysés en fonction d'âge ($n = 80$)	30
Figure 23 : Secteur graphique représentant la répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe ($n = 80$)	31

Figure 24: Barre groupée des bactéries isolées selon le genre bactérien ($n = 146$)32

Liste des tableaux

Tableau 1 : Le matériel non biologique au niveau du laboratoire17

Table des matières

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I.	Partie bibliographique.....	1
	Chapitre I : Les Bactéries Anaérobies Strictes.....	1
1	Généralités.....	2
1.1	Historique.....	2
1.2	Définition.....	2
1.3	Classification des bactéries anaérobies strictes.....	3
1.4	Les espèces anaérobies souvent responsables des abcès et des suppurations profondes.....	3
1.4.1	Bacilles à Gram positif non sporulés.....	4
1.4.2	Bacilles à Gram négatif.....	4
1.4.3	Cocci à Grams positif.....	5
1.4.4	Cocci à Gram négatif.....	5
1.5	Résistance aux antibiotiques.....	5
	Chapitre II : Les Infections Profondes dues aux Bactéries Anaérobies.....	8
2	Définition.....	8
2.1	Les abcès.....	8
2.1.1	Les étapes de formation d'abcès.....	8
2.1.2	Les types d'abcès.....	8
2.2	Les suppurations profondes.....	9
2.3	La physiopathologie.....	9
2.4	Les facteurs favorisant les infections à bactéries anaérobies.....	10
2.4.1	Facteurs liés à l'hôte.....	10
2.4.2	Facteurs liés à la bactérie (facteurs de virulence).....	10
	Chapitre III : Diagnostic des infections à bactéries anaérobies strictes et leur traitement... ..	12
3	Techniques de diagnostic des infections à bactéries anaérobies.....	12
3.1	Recueil du prélèvement.....	12
3.2	Transport du prélèvement au laboratoire.....	12

3.3	Mise en culture	12
3.4	Méthodes d'identification	13
3.4.1	Identification macroscopique et microscopique	13
3.4.2	Identification biochimique	13
3.4.3	Autres méthodes utilisées pour l'identification des Bactéries Anaérobies	13
3.5	Etude de la sensibilité aux antibiotiques	13
3.6	Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques	14
4	Le traitement des infections à bactéries anaérobies.....	15
	Partie expérimentale.....	12
II.	Matériel et méthode	12
1.	Lieu et durée de stage	16
2.	Objectif de l'étude	16
4.	Matériel.....	17
4.1	Matériel non biologique	17
4.2	Matériel biologique	18
5	Méthodes	18
5.1	Mise en culture	18
5.1.1	Préparation de milieu culture	18
5.1.2	Ensemencement	19
5.1.3	Incubation.....	20
5.1.4	Lecture des boîtes	20
5.2	Identification morphologique et biochimique des bactéries anaérobies	20
5.3	Etude de sensibilité aux antibiotiques	21
III.	Résultats et discussion	16
1.	Résultats.....	22
1.1.	Diagnostic bactériologique.....	22
1.1.1.	Observation microscopique	22
1.1.2.	Tests biochimiques : galeries miniaturisées d'identification	23
1.1.3.	Etude de la sensibilité aux antibiotiques.....	24
1.2.	Etude rétrospective.....	27
1.2.1.	Répartition totale des pourcentages des prélèvements positifs et négatifs des infections à bactéries anaérobies.....	27
1.2.2.	Répartition du nombre des prélèvements totaux analysés en fonction des années.....	27
1.2.3.	Répartition du nombre des prélèvements en fonction de leurs types.....	28

1.2.4.	Répartition des prélèvements négatifs en fonction de la prise préalable ou non d'un antibiotique.....	29
1.2.5.	Répartition des prélèvements positifs analysés en fonction de l'âge.....	30
1.2.6.	Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe.....	30
1.2.7.	Répartition des bactéries anaérobies strictes isolées par genres.....	31
1.2.8.	Résistance aux antibiotiques.....	32
2.	Discussion.....	34
2.1.	Identification bactériologique.....	34
2.2.	Etude rétrospective.....	34
2.2.1.	Les prélèvements totaux des infections à bactéries anaérobies.....	35
2.2.2.	Les prélèvements positifs analysés en fonction des années.....	35
2.2.3.	Les prélèvements analysés en fonction de leurs types.....	36
2.2.4.	Les prélèvements analysés en fonction de l'âge et de sexe.....	36
2.2.5.	Les bactéries anaérobies strictes isolées par genre.....	37
2.2.6.	Résistances aux antibiotiques.....	38
	Conclusion.....	42
	Références bibliographiques	
	Annexes	
	Résumé	



Introduction

Dans le corps humain, il existe des espèces de micro-organismes naturellement présentes, appelées flore endogène, qui jouent un rôle protecteur. Cependant, en cas de traumatisme ou de conditions favorables à la pathogénicité, ces micro-organismes peuvent migrer vers des zones stériles du corps et devenir pathogènes. [1]

Les infections des tissus profonds et des espaces confinés du corps sont souvent associées aux bactéries anaérobies, qui peuvent survivre et se reproduire en absence d'oxygène. Ces infections peuvent entraîner la formation d'abcès et de suppurations profondes, affectant les muscles, les os ou les organes mous [1].

Dans plus de 80% des cas il s'agit d'une infection mixte, associant bactéries aérobies ou aéro- anaérobies et anaérobies stricts [2].

Cependant, actuellement il est devenu de plus en plus important d'identifier les bactéries anaérobies à cause de leurs incidences accrues de la gravité des infections qu'elles provoquent et de leurs résistances croissantes aux antibiotiques [1].

Pour cela les bactériologistes disposent de certains indices pour suspecter une infection à bactéries anaérobies mais ils doivent aussi mettre en œuvre des techniques pour une meilleure détection, identification, rapide et économique de ces bactéries [3].

Une étude rétrospective multicentrique a été réalisée au laboratoire des "Bactéries Anaérobies et du Botulisme" à l'Institut Pasteur d'Alger afin d'analyser les infections des abcès et des suppurations profondes causées par des bactéries anaérobies limitées aux : poches parodontale, péritonite, abcès cérébral, infection articulaire, pleurésie et abcès hépatique. Cette étude s'est déroulée sur une période de cinq ans, de 2018 à 2023, en examinant les données des patients souffrant de ces infections. Les résultats de cette étude ont permis d'obtenir une analyse précieuse concernant la fréquence et les types de bactéries anaérobies impliquées dans les infections profondes citées précédemment ainsi que leurs sensibilités aux antibiotiques.

Le présent document est réparti en trois parties : une introduction, la partie bibliographique, la partie expérimentale réalisée à l'Institut Pasteur incluant la partie Matériel et méthodes, la partie résultats et la discussion.



I. Partie bibliographique

*Chapitre I : Les Bactéries Anaérobies
Strictes*

1 Généralités

1.1 Historique

Les premières descriptions d'infections causées par des bactéries anaérobies remontent à l'Antiquité. Cependant, la première isolation d'une bactérie anaérobie spécifique, *Clostridium septicum*, a été réalisée par Pasteur et Joubert en 1877 [3]. Leur découverte a marqué une avancée significative dans la compréhension des bactéries anaérobies. L'article de Veillon et Zeuber publié en 1897, intitulé "Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie", est un ouvert de nouvelles perspectives pour les recherches sur les bactéries anaérobies. Leur étude a montré que les abcès contenant un pus fétide étaient associés à la présence de microbes strictement anaérobies. Cela a conduit Veillon à différencier deux grands groupes de bactéries anaérobies dès 1898 la flore tellurique, exogène, toxigène : Ce groupe comprend les bactéries du genre *Clostridium*, telles que *Clostridium tetani* et *Clostridium botulinum*. Ces bactéries anaérobies sont présentes dans l'environnement, en particulier dans le sol, et certaines d'entre elles peuvent produire des toxines dangereuses et la flore, endogène, non toxigène mais virulente [3]. Aujourd'hui, cette classification a été révolutionnée par les études de biologie moléculaire, notamment le séquençage du gène ARNr 16S.

1.2 Définition

Les bactéries anaérobies strictes sont des microorganismes capables de croître et de survivre dans un environnement dépourvu d'oxygène ou presque dépourvu d'oxygène [1]. Ces bactéries sont incapables d'intégrer de l'oxygène moléculaire dans leur cytoplasme en raison de l'absence d'oxydase. De plus, elles ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour neutraliser les produits toxiques dérivés de l'oxygène moléculaire, à savoir la catalase, la peroxydase et le superoxyde dismutase [4]. Elles utilisent les ions nitrates comme accepteurs d'électrons et tirent leurs énergies de réaction de fermentation dans lesquelles les accepteurs d'électrons sont des composés organiques [1].

Le degré de sensibilité à l'oxygène est variable d'une espèce à l'autre, c'est ainsi qu'il existe :

Les bactéries anaérobies microaérophiles : supportent l'O₂ mais elles peuvent également croître mieux en anaérobiose [5].

Les bactéries dites EOS (extremely oxygen sensitive) : ne peuvent croître que si l'O₂ est absent [5].

Les bactéries anaérobies strictes : ne peuvent pas croître que si la concentration d'oxygène est inférieure à 2% [5].

1.3 Classification des bactéries anaérobies strictes

En bactériologie médicale, il existe environ 400 espèces de bactéries anaérobies qui suscitent un intérêt important [6]. La taxonomie de ces bactéries est en constante évolution en raison de l'émergence de méthodes d'étude de plus en plus avancées.

Traditionnellement, la classification des organismes reposait principalement sur des caractéristiques phénotypiques observables, telles que la morphologie, la physiologie ou le comportement (classification de Linné). Cependant, ces caractéristiques peuvent être influencées par de nombreux facteurs, y compris l'environnement, ce qui peut rendre la classification subjective et parfois peu fiable.[6] En intégrant les informations génétiques et phénotypiques, permettent de déterminer les relations phylogénétiques avec une précision accrue tels que : Etude des profils électrophorétiques des enzymes et des profils protéiques, analyse des acides gras cellulaires par spectrométrie de masse (technique MALDI-TOF), détermination du G+C%, techniques d'hybridation ADN/ADN). Cela conduit à une classification plus fiable et moins sujette à l'influence de facteurs environnementaux [3].

Ces avancées ont conduit à des remaniements importants dans la nomenclature des espèces. Certaines espèces ont été reclassées ou réattribuées en fonction de leur relation génétique plutôt que de leurs caractéristiques phénotypiques. De nouvelles espèces ont été découvertes grâce à l'analyse génétique et ont été intégrées dans la nomenclature. (**Voir Annexe 1**)

1.4 Les espèces anaérobies souvent responsables des abcès et des suppurations profondes

Les bactéries anaérobies souvent responsables des infections profondes font partie de la flore endogène, également appelée flore de Veillon, et habitent naturellement les cavités du corps humain et des animaux [4]. (**Voir Annexe 2**)

Elles survivent en tant que bactéries commensales, car elles sont associées à des bactéries aérobies facultatives qui consomment l'oxygène. Ces bactéries anaérobies se comportent comme des opportunistes. Mais elles peuvent devenir pathogènes dans deux situations [4].

- Lorsqu'elles se multiplient de façon exagérée et remplacent la flore normale.

- Lorsqu'elles envahissent les tissus ou les cavités stériles de l'organisme.

1.4.1 Bacilles à Gram positif non sporulés

Les bacilles gram positif non sporulés regroupent de nombreux genres bactériens appartenant à deux phylums : *Actinobacteria* et *Frimicutes*. Parmi les principaux genres on retrouve des bacilles réguliers plus ou moins allongés : *Eubacterium*, *Lactobacillus* et des bacilles diphtérimorphes présentant parfois des pseudos ramifications : *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* et *Actinomyces*. Les bacilles gram positifs sont des pathogènes opportunistes [3].

Habitat : les bacilles à Gram positifs font partie de la flore normale endogène, orale, intestinale, vaginale et cutanée [1].

Pouvoir pathogène : ces bactéries sont souvent responsables des infections pelviennes, abdominales et d'arthrite.

Les caractères biochimiques de : *Actinomyces* et *Propionibacterium* sont résumés dans les annexes 3, 4 respectivement.

1.4.2 Bacilles à Gram négatif

Ils peuvent se présenter sous forme plus ou moins allongées (*Bactériodes fragilis*), parfois très petites (*Prevotella* et *Porphyromonas*) et d'autres sous forme de coccobacilles très polymorphes (*Fusobacterium*). Ils exigent pour leurs croissances de l'hémine et parfois de la vitamine K1 comme dans le cas de *Porphyromonas* [3].

Habitat : La majorité des espèces de bacilles à Gram négatif font partie de la flore endogène humaine dans la cavité orale, gastro intestinale et vaginale. Elles sont souvent isolées dans des infections polymicrobiennes [1].

Pouvoir pathogène : ces bactéries peuvent causer des infections intra-abdominales, gynécologiques, pleuropulmonaires, buccodentaires ainsi que des bactériémies et des infections pelvipéritonite.

Les Bacteroides : le groupe de *Bacteroides fragilis* est impliqué dans de nombreuses infections et comporte les espèces les plus résistantes parmi les bactéries anaérobies.

Les caractères biochimiques des bacilles à Gram négatif (*Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella bivia* et *Porphyromonas gingivalis*) sont inscrits dans l'annexe 5.

1.4.3 Cocci à grams positif

Ce sont des groupes bactériens anaérobies les plus fréquemment isolées des échantillons cliniques. On retrouve essentiellement dans ce groupe le genre *Peptococcus* et *Peptostreptococcus*. [3]

Habitat : ils font parties des microbiotes endogènes bucco-dentaires, des voies respiratoires supérieures, cutanées, génitales et digestives de l'homme.

Pouvoir pathogène : abcès du foie, du cerveau, des poumons et infections vaginales et intra-abdominales.

1.4.4 Cocci à Gram négatif

Ils sont représentés par la flore de Veillon d'origine buccale ou gastro-intestinal [7].

Veillonella : Bactérie arrondie, à Gram négatif, anaérobie stricte, cocciforme, dont l'espèce la plus isolée est *v.parulva* [8].

Pouvoir pathogène : elles sont généralement non pathogènes, mais lorsqu'elles s'associes à d'autres bactéries pathogènes, elles peuvent causer des infections localisées telles que les périodontites, bactériemies, endocardites et ostéomyélite.

- Pour voir les différentes espèces des bactéries anaérobies responsables des infections suppuratives veuillez consulter l'**annexe 6**.

1.5 Résistance aux antibiotiques

Les bactéries anaérobies strictes, tout comme d'autres germes, peuvent manifester de nombreuses résistances naturelles ou acquises aux antibiotiques. Chaque espèce de BAS présente des caractéristiques spécifiques en termes de résistance naturelle et d'épidémiologie de la résistance, ce qui nécessite une connaissance approfondie pour guider les médecins vers des traitements antibiotiques efficaces. Les résistances acquises peuvent affecter la majorité des molécules utilisées dans les infections à anaérobies, bien que dans de nombreux cas, les souches demeurent sensibles aux associations de pénicillines et inhibiteurs de bêta-lactamase (en particulier la pipéracilline-tazobactam), aux carbapénèmes et au métronidazole. Cependant, des souches multirésistantes ont été identifiées parmi les *Bacteroides* du groupe *fragilis*, qui sont fréquemment impliqués dans les infections [9].

Les BAS présentent 4 résistances naturelles : aminosides, aztreonam, thrimethoprimes, quinolones [10] :

- La résistance aux aminosides est due à l'absence de système de transport oxydatif chez les bactéries anaérobies.
- La résistance à l'aztréonam est due à la faible affinité de cette molécule au PLP (protéine liant la pénicilline) exception pour le genre *Fusobacterium*.
- La résistance au triméthoprim est due à la forte activité du dihydrofolate réductase chez les BAS.
- Les fluoroquinolones ont une faible activité sur les BAS exp : ofloxacine, ciprofloxacine, lévofloxacine[11].

Les antibiotiques agissant sur : la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, ou par inhibition de la synthèse protéique ou le fonctionnement des acides nucléiques (**voir annexe 7**)

Les principaux mécanismes de résistance acquis aux antibiotiques sont les suivants :

- **La modification de la cible** : Les bactéries comme *Peptostreptococcus* spp et *Bacteroides fragilis* peuvent muter les cibles des antibiotiques, telles que les enzymes ou les protéines, ce qui réduit l'affinité de liaison entre l'antibiotique et sa cible exemple des bêta lactamines qui ciblent la transpeptidase PLP, par acquisition de gènes qui vont modifier la structure des PLP. Outre on peut avoir un défaut d'accès à la cible par densification de la paroi ou par la synthèse de porines et enfin carrément la synthèse d'une nouvelle cible [11].
- **Synthèse d'enzymes** : Certaines bactéries produisent des enzymes capables de dégrader ou de modifier les antibiotiques, rendant ainsi ces substances inefficaces, par exemple, *Bacteroides fragilis* sécrète des enzymes de type bêta lactamases qui inactivent les bêta lactamines comme la pénicilline [11].
- **Diminution de la perméabilité** : Les bactéries anaérobies peuvent réduire la perméabilité de leur membrane externe, reflétant ainsi l'entrée de l'antibiotique dans la cellule. La membrane externe des bactéries Gram négatif, comme *Bacteroides fragilis*, est composée d'une double couche lipidique complexe. Les porines, des protéines de la membrane externe, jouent un rôle dans le contrôle de la perméabilité en facilitant ou limitant le passage de molécules à travers la membrane. Les souches résistantes peuvent modifier les porines ou réguler leur expression de manière à réduire la perméabilité, empêchant ainsi les antibiotiques d'entrer efficacement dans la cellule. En conséquence, cette diminution de la perméabilité contribue à la résistance de *Bacteroides fragilis* aux antibiotiques, rendant plus difficile le traitement des infections associées à cette bactérie.

Comprendre ces mécanismes est essentiel pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces et lutter contre la résistance aux antibiotiques. [11].

- **Efflux actif** : Les bactéries anaérobies comme *Prevotella* peuvent développer des pompes d'efflux qui sont des protéines membranaires spécialisées permettant de pomper activement les antibiotiques hors de la cellule bactérienne. Cela empêche l'accumulation suffisante de l'antibiotique à l'intérieur de la cellule pour qu'il soit efficace [11].

La résistance acquise concerne que quelques souches d'une espèce donnée, mais elle peut se propager de manière significative. Elle résulte de changements dans le matériel génétique de la bactérie par le biais de mutations, de la transduction ou, plus fréquemment, de l'acquisition d'un plasmide contenant des gènes de résistance. L'expression de ces gènes permet à la bactérie de tolérer une concentration plus élevée d'antibiotique que celle qui inhibe les souches sensibles de la même espèce. L'acquisition de résistance est liée à l'utilisation croissante d'antibiotiques [9].

Certains *Bacteroides* peuvent résister ou présenter une sensibilité réduite aux 5-nitro-imidazolés en raison de la présence probable d'une enzyme appelée 5-nitro-imidazole réductase [11].

*Chapitre II : Les Infections Profondes dues
aux Bactéries Anaérobies*

2 Définition

Une infection est une invasion d'un organisme vivant par des micro-organismes pathogènes. Les infections bactériennes surviennent lorsque les bactéries échappent au système immunitaire de l'hôte. Elles provoquent un état pathologique par lésion des cellules locales, libération de substance toxique, ou par l'effet de réaction immunologique [12].

2.1 Les abcès

Il s'agit d'un amas de pus qui se forme dans une cavité créée par une inflammation dans un tissu suite à une infection bactérienne [13]. Cette accumulation de pus peut se trouver à différents endroits du corps, qu'il soit superficiel ou profond, et peut affecter des personnes de tout âge [14].

2.1.1 Les étapes de formation d'abcès

- Phase inflammatoire : est caractérisée par une première réaction immunitaire et changement vasculaire où les vaisseaux sanguins se dilatent, entraînant un afflux sanguin vers la zone infectée. Les parois des vaisseaux deviennent perméables, permettant aux cellules immunitaires et aux liquides de passer à travers les neutrophiles, des cellules immunitaires, sont attirés vers la zone infectée pour combattre les agents pathogènes [13].
- Phase de collection : après formation de pus de cellule détruites, polynucléaires, débris tissulaires et microbiens, la collecte de ce pus peut se faire dans une poche inflammatoire bien limitée. Le pus formé est un liquide épais, généralement de couleur crème, mais peut avoir une couleur ou une odeur plus caractéristique selon l'agent pathogène.

2.1.2 Les types d'abcès

- **Abcès cérébral** : Collection purulente formée à l'intérieur du tissu cérébral : empyème intracrânien : accumulation de pus qui se développe dans l'espace sous-dural ou dans l'espace extra-dural causée par une infection bactérienne [1].
- **Abcès parodontal** : Un abcès parodontal est décrit comme une accumulation de pus localisée dans la paroi gingivale d'une poche parodontale. Plus répandu chez les patients ayant déjà eu des poches parodontales, il se développe rapidement, détruisant les tissus parodontaux et présentant des symptômes évidents tels que la rougeur de la gencive avec un gonflement localisé [11].

- **Abcès pulmonaire** : il est souvent causé par une infection bactérienne ou parasitaire et peut causer de la fièvre, des douleurs thoraciques et de la toux [14].
- **Abcès hépatique** : L'abcès hépatique est une maladie à la fois rare et cliniquement significative, qui peut être mortelle. Elle est caractérisée par une accumulation de pus entourée d'une capsule dans le tissu du foie, causée par une infection bactérienne [14].

2.2 Les suppurations profondes

Ce Sont des infections bactériennes qui se développent en profondeur dans le corps, généralement dans les tissus mous et les organes [14], on peut citer :

- **Infection vaginale** : appelée vaginose, c'est lorsque l'équilibre des bactéries est perturbé, par exemple à cause d'un changement hormonal, d'un stress ou d'un rapport sexuel non protégé, les bactéries anaérobies peuvent proliférer, ce qui peut entraîner une infection vaginale [1].
- **Infection articulaire** : est une infections qui touche un os ou une articulation, qu'il y ait ou non du matériel étranger (vis, clou, plaque).[11]
- **Pleurésie** : est une inflammation de la plèvre, la membrane recouvrant les poumons, la cause initiale est une infection virale ou bactérienne.[3]
- **Péritonite** : est une inflammation aiguë du péritoine qui est la membrane qui recouvre les viscère et les parois de la cavité abdominale.[3]

2.3 La physiopathologie

Les bactéries anaérobies sont généralement présentes dans des sites colonisés où elles contribuent aux barrières protectrices contre l'implantation de pathogènes exogènes. Cependant, certaines circonstances peuvent encourager la migration des bactéries anaérobies vers des tissus adjacents qui sont normalement stériles ce qui entraîne une infection locale. A partir de ce foyer primitif, elles peuvent causées une septicémie et générer des foyers secondaires en cas de conditions favorables [15].

Les étapes d'une infection à bactéries anaérobies

Destruction tissulaire initiale : la destruction initiale des tissus survient suite à divers événements tels que : des traumatismes, des accidents, des extractions dentaires, des ruptures d'appendice, ainsi que des interventions chirurgicales orales, gynécologiques ou abdominales [2].

Développement de l'infection primaire : les aéro-anaérobies facultatifs réduisent le potentiel d'oxydoréduction localement, créant ainsi des conditions propices au développement des anaérobies commensaux présents sur le site de l'infection [16].

Dissémination : Les bactéries anaérobies peuvent causer une septicémie et générer des foyers secondaires en cas de conditions favorables tels que *Peptostreptococcus* spp et *Bacteroides fragilis* [16]

Colonisation : Dans les zones éloignées où la vascularisation est insuffisante, ce qui crée des conditions d'anaérobiose, des micro-caillots peuvent se former et se multiplier dans les capillaires étroits. Cette situation favorise la formation d'un ou de plusieurs thrombus septiques [16].

Abcédation : Lorsqu'une infection se développe et que les bactéries se multiplient, un processus d'abcédation peut se produire, cela implique la formation d'un abcès. Les bactéries de l'abcès peuvent pénétrer dans la circulation sanguine par voie hématogène. Elles peuvent être transportées par le flux sanguin vers d'autres sites du corps, où elles peuvent causer de nouvelles infections ou provoquer des complications [16].

2.4 Les facteurs favorisant les infections à bactéries anaérobies

2.4.1 Facteurs liés à l'hôte

- L'âge ; les infections sont plus fréquentes chez les sujets âgés en particulier ceux qui présentent un déficit immunitaire [9].
- Un traumatisme ou un acte chirurgical affectant les habitats naturels des bactéries anaérobies (tractus digestif, voies génito-urinaires) [9].
- Tout facteur engendrant une diminution de la pression tissulaire en oxygène : ischémie locale, corps étrangers et l'ischémie tissulaire (diminution du potentiel redox) [9].
- Une déficience immunitaire qu'elle que soit la cause : diabète déséquilibré, cancers, transplantation d'organes, infection par le VIH, Corticothérapie au long cours (locale ou générale) [9].

2.4.2 Facteurs liés à la bactérie (facteurs de virulence)

Pour certains germes anaérobies, ces facteurs peuvent leur conférer une aérotolérance, c'est-à-dire une capacité à survivre et à se développer en présence d'oxygène, même s'ils sont principalement anaérobies. Cette aérotolérance peut être atteinte en maintenant un potentiel

d'oxydoréduction abaissé grâce à la production et l'excrétion d'acides gras à courte chaîne et d'autres acides organiques [17].

- **Facteurs d'adhésion :** ceratines germes anaérobies comme *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* et *Peptostreptococcus* possèdent des structures protéiques, notamment les fimbriaes, les pilis et la capsule polysaccharidique, qui leur permettent de s'adhérer aux surfaces cellulaires. Ces structures filamenteuses favorisent leur attachement aux tissus, facilitant ainsi leur colonisation et leur persistance dans l'environnement [16].

Par exemple *Bacteroides fragilis* possède une capsule polysaccharidique qui joue un rôle dans la formation d'abcès, l'inhibition de la phagocytose et l'adhésion aux cellules épithéliales qui explique les difficultés d'éradication mécanique de la bactérie lors des lavages péritonéaux.

- **Les toxines :** Certaines espèces élaborent une entérotoxine tel que *Fusobacterium necrophorum* sécrète une leucotoxine, une hémolysine, une hémagglutinine, une endotoxine liée au lipopolysaccharides (LPS) [16].
- **Les enzymes :** sont impliquées dans la destruction ou la modification tissulaire par les bactéries anaérobies, on peut citer les collagénases, les hyaluronidases, les fibrinolysines et les protéases. Par exemples : Les protéases dégradent les IgA1 et peuvent favoriser la croissance des bactéries anaérobies comme *Porphyromonas* et *Prevotella* à la surface des muqueuses [16].

*Chapitre III : Diagnostic des infections à
bactéries anaérobies strictes et leur
traitement*

3 Techniques de diagnostic des infections à bactéries anaérobies

3.1 Recueil du prélèvement

La qualité du prélèvement est déterminante pour assurer un bon isolement, une identification précise et une fiabilité des résultats obtenus. Pour cela, il est crucial de choisir avec soin le site et l'heure de prélèvement, ainsi que les conditions de température et d'humidité dans lesquelles les échantillons sont placés. Il est également important d'utiliser les techniques et les matériels adéquats afin d'éviter toute contamination éventuelle par la flore endogène ou la mort des espèces anaérobies strictes [1].

3.2 Transport du prélèvement au laboratoire

Il est crucial de respecter un délai maximal de 2 heures à température ambiante pour acheminer les prélèvements au laboratoire afin de préserver la charge microbienne initiale de l'échantillon et prévenir la détérioration des bactéries pathogènes fragiles. C'est pour cela que des milieux de transport spécifiques sont utilisés [14].

3.3 Mise en culture

L'isolement nécessite des milieux gélosés, contenant de nombreux facteurs de croissance et rendus sélectifs grâce à l'addition d'antibiotiques. Il est important de toujours utiliser des milieux désoxygénés (régénérés), fraîchement préparés et conservés en anaérobiose avant leur utilisation [2].

- Milieu gélosé pour les bacilles à Gram négatif (exemple Schaedler au sang avec vancomycine et néomycine. Ce milieu permet l'isolement des *Bacteroides fragilis*, *Prevotella* et des *Fusobacterium*).
- Gélose Columbia au sang et au phényléthylalcool spécifique des bactéries à Gram positif et des *Porphyromonas*.
- Milieu gélose colombia au sang additionnée de l'hémine et la vitamine K pour favoriser la croissance des bacilles à Gram négatif tels que *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas*.
- Milieu d'enrichissement TGY : utilisé pour la culture de la plupart des bactéries anaérobies.

Ensemencement : toutes les boîtes et les milieux liquides ensemencés sont incubés en anaérobiose pendant 5 jours et pour cela on utilise soit des jarres chimiques (Genbag ou Genbox) ou des jarres physiques (mélange gazeux composée de 90% de N₂, 5% de CO₂ et 5% de H₂).

3.4 Méthodes d'identification

3.4.1 Identification macroscopique et microscopique

L'examen macroscopique permet d'observer plusieurs caractéristiques visibles à l'œil nu sur une culture bactérienne. Ces caractéristiques incluent l'aspect de la colonie, telle que sa taille et sa forme, sa couleur (qui peut être blanche, jaune, etc.), son odeur (qui peut être fétide ou malodorante), la présence ou non d'hémolyse, ainsi que sa fluorescence aux UV. La coloration de Gram permet de différencier et de classer les bactéries selon la Morphologie (coques, bacilles, etc.), le groupement (diplocoques, en chainettes, etc.) et le Gram (Gram positif et Gram négatif).

3.4.2 Identification biochimique

C'est une série des tests biochimiques basés sur l'utilisation d'une galerie miniaturisée API 20A qui incluent la recherche d'oxydase, de catalase, d'indole, de gélatinase et de l'hydrolyse de l'urée ainsi que l'étude de la fermentation des sucres. Par ailleurs, l'analyse des caractéristiques enzymatiques et la fermentation de certains glucides (tels que le mannose et le raffinose) sont réalisées grâce à la galerie miniaturisée Rapid® ID 32A [18].

3.4.3 Autres méthodes utilisées pour l'identification des Bactéries Anaérobies

- **La spectrométrie de masse (MALDI-TOF)** : La spectrométrie de masse MALDI-TOF est largement utilisée en microbiologie clinique pour l'identification des bactéries anaérobies en analysant leurs protéines totales, notamment les protéines ribosomales et les protéines associées aux membranes en quelques minutes seulement. Elle offre une rapidité, une précision, une fiabilité et une rentabilité supérieures par rapport aux méthodes phénotypiques conventionnelles [19].
- **La biologie moléculaire** : Plusieurs techniques sont basées sur la détection des acides nucléiques, telles que la PCR ciblée avec des amorces spécifiques et le séquençage de l'ARN 16S [1].

3.5 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

C'est un test au laboratoire pour évaluer la sensibilité ou la résistance d'une bactérie aux antibiotiques. Son objectif est d'aider les médecins à choisir le traitement optimal contre une

infection bactérienne spécifique. Cependant, l'antibiogramme ne doit être réalisé que si la probabilité d'implication de la bactérie dans l'infection est élevée [14].

3.6 Techniques d'étude de la sensibilité aux antibiotiques

- **Techniques standard des disques**

En utilisant la technique de diffusion en milieu gélosé qui permet de mesurer des diamètres d'inhibition de la croissance d'une bactérie autour d'un disque imprégné d'antibiotique et de les comparer à des diamètres critiques [20].

Selon EUCAST le milieu gélosé utilisée pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques c'est la gélose Brucella Agar enrichi en hémine et en vitamine K₁, additionnée de 5 % de sang de mouton.

- **Technique des CMI par les E-tests**

Il s'agit d'une technique de diffusion en milieu gélosé permettant de donner une mesure précise de la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique en utilisant des bandelettes à gradient de concentration comme les bandelettes des E-test. Cette technique a permis d'introduire des propositions permettant l'aide à la prescription ou à l'adaptation thérapeutique (voir **annexe 8**) [21].

- **CMI en milieu liquide**

Cette technique consiste à étudier la croissance d'une souche bactérienne en présence de concentrations croissantes d'antibiotiques et déterminer par la suite la plus faible concentration inhibant toute croissance bactérienne visible [15].

Une gamme de concentrations d'antibiotiques est préparée à partir d'une solution d'antibiotique dans du bouillon Brucella enrichi en hémine (5 mg/L) et en vitamine K₁ (1 mg/L). Ces dilutions sont ensuite distribuées soit dans des tubes (macrodilution) soit dans des puits d'une microplaque (microdilution) [15].

La technique par microdilution a été validée comme méthode de référence pour certains germes anaérobies particulièrement pour *Bacteroides fragilis*, en raison de leur relative aérotoleérance. Mais cette méthode est particulièrement longue à réaliser et est adaptée à un nombre réduit d'antibiotique et la lecture parfois est difficile [15].

4 Le traitement des infections à bactéries anaérobies

Le traitement des infections bactériennes anaérobies dépend du type et de la gravité de l'infection, ainsi que de la localisation de l'infection dans le corps. Voici quelques approches couramment utilisées pour ce traitement [16]:

L'antibiothérapie : Ce traitement reste compliqué car les bactéries anaérobies strictes sont souvent retrouvées dans des infections polymicrobiennes en association avec d'autres germes aérobies, donc le choix de l'antibiotique dépendra de la sensibilité de la bactérie responsable de l'infection [16].

Le drainage chirurgical : Dans la plupart des cas à (l'exception des pneumopathies), notamment lors d'infections intra-abdominales ou d'abcès, il peut être nécessaire de recourir à une procédure chirurgicale pour drainer l'infection. Le drainage chirurgical consiste à éliminer l'accumulation de pus et à favoriser la guérison [1].



Partie expérimentale



II. Matériel et méthode

1. Lieu et durée de stage

Notre stage a été effectué au niveau du laboratoire des "Bactéries Anaérobies et du Botulisme" de l'Institut Pasteur d'Algérie à Dely-brahim pendant 4 mois, du 1^{er} mars au 30 juin 2023.

2. Objectif de l'étude

Le but principal de notre étude est de déterminer l'implication des bactéries anaérobies dans diverses infections suppuratives profondes limitées aux : poches parodontale, péritonites, abcès cérébral, infection articulaire, pleurésie et abcès hépatique, souvent négligées par les cliniciens.

L'objectif secondaire de cette étude est la mise en évidence des bactéries anaérobies par des méthodes de culture et d'identification morphologique et biochimique, ainsi que l'étude de leurs sensibilité aux antibiotiques.

Une étude rétrospective a été menée en utilisant des données médicales préexistantes provenant de fiches de renseignements recueillies (**annexe 9**) entre le 1er janvier 2018 et le 30 avril 2023. Au cours de cette période, nous avons analysé un total de 128 échantillons de type poches parodontale, liquide péritonéale, abcès cérébral, liquide synovial, liquide pleurale et abcès hépatique.

3. Recueil de données

Tous les prélèvements destinés au laboratoire des bactéries anaérobies doivent être transportés le plus rapidement possible en respectant les conditions optimales, en évitant tout ce qui pourrait compromettre leur intégrité accompagnées d'une fiche de renseignements correctement remplie avec tous les détails nécessaires. Il existe des milieux spéciaux de transport pour les prélèvements à bactéries anaérobies tels que le milieu Amies (semi gélosé ou liquide contient un tampon phosphate inorganique et du charbon de bois et d'un indicateur coloré).

Ces prélèvements doivent être réalisés à distance de toute antibiothérapie qui risque de masquer la présence de bactéries difficiles à mettre en évidence [22].

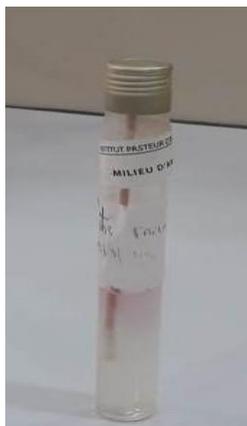


Figure 1 : Milieu de transport Amies (Photographie prise au niveau de laboratoire de l’IPA)

4. Matériel

4.1 Matériel non biologique

Tableau 1 : Le matériel non biologique au niveau du laboratoire

Appareillage	Verrerie	Réactifs	Autre matériel
Anoxomat	Pipettes	Rouge de méthyl	Aiguilles et scalpels
Bain marie	Pasteur	Xylène	Boites de Pétri
Réfrigérateur	Lames	Eau distillée	Bec bunsen
Etuve microbiologique 37°C	Tube à essais	Vaseline	Ecouvillon, pince, poire
Micropipettes (10- 1000 µl)	Pipettes graduées	Eau oxygénée H ₂ O ₂	Distributeurs d’antibiotiques
Microscope	Jarres	Violet de gentiane	Disques d’ATB
Balance	anaérobies	Alcool	E-test
PSM		Lugol	Tube stérile
Centrifugeuse		Fuchsine	Gants à usage unique
Vortex		Bleu de méthylène	Huile à immersion
Densitomètre		Glycérol	Indicateur universel de Ph (prolabo)
Etuve à Séchage		Médium API20A	Les galeries API20A et ID32A
Thermocycleur		Medium ID32A	

4.2 Matériel biologique

- Les différents prélèvements reçus au laboratoire.
- La Gélose Columbia au sang frais
- Le sang du mouton
- Gélose Columbia au sang + antibiotique (acide nalidixique)
- Gélose au sang laqué
- Bouillon TGY (trypticase extrait de levure glucose)
- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol pour les champignons

5 Méthodes

5.1 Mise en culture

5.1.1 Préparation de milieu culture

Pour la préparation des milieux de culture nous avons suivi les étapes suivantes :

- Faire fondre la gélose Columbia dans de l'eau portée à ébullition ensuite laisser refroidir jusqu'à une température de surfusion comprise entre 45 et 50°C [Figure 2].



Figure 2: Flacon de gélose Columbia de 250ml prêt à l'emploi dans un bain marie (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)



Figure 3 : Tube contenant 10 ml de sang de mouton (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)

- Ajout de 5 à 10 % de sang de mouton à la gélose Columbia en prenant soin de maintenir les conditions d'asepsie [Figure3].
- Pour homogénéiser le mélange sans créer de bulles d'air, il convient d'exercer des mouvements rotatoires délicats sur le flacon, placé sur la paillasse.
- Couler le milieu de culture puis homogénéiser le mélange sans créer de bulles d'air, en exerçant des mouvements rotatoires délicats sur la boîte placée sur la paillasse.
- Effectuer un séchage des boîtes de Pétri en les plaçant partiellement ouvertes dans une armoire de séchage.



Figure 5 : Addition du sang à la gélose Columbia (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)



Figure 4 : Coulage du Falcon dans les boîtes de Pétri (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)

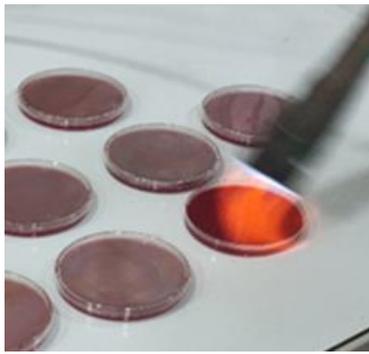


Figure 7 : Technique d'élimination des bulles d'air. (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)



Figure 6 : Séchage des boîtes (Photographie prise au niveau de laboratoire de l'IPA)

Remarque : tous les milieux gélosés doivent être préparés extemporanément.

5.1.2 Ensemencement

Prélèvement liquide : On dépose une goutte du prélèvement liquide à la surface de la gélose, puis à l'aide d'une pipette stérile, on l'étale en utilisant la méthode des 4 quadrants.

Prélèvement solide : D'abord on effectue un broyage de l'échantillon à l'aide d'un mortier ensuite on additionne le milieu d'enrichissement TGY, et on ensemence une goutte de l'échantillon.

L'isolement se fait sur :

- Une gélose Columbia + 5% de sang de mouton, incubé en anaérobiose pendant 2 à 5 jours à 37°C.
- Une gélose Columbia au sang laqué (ce milieu permet une meilleure visualisation de la pigmentation des colonies), incubé en anaérobiose à 37°C pendant 5 jours.

- Des géloses Columbia au sang de mouton, additionnées d'agents sélectifs tels que l'acide nalidixique à 100 µg/ml [3].
- Un milieu d'enrichissement TGY.

5.1.3 Incubation

Nous avons placé les boîtes de Pétri et les milieuxensemencés dans une jarre d'anaérobiose, puis ajouté les catalyseurs à l'intérieur de cette jarre, ensuite, la jarre est reliée à un générateur d'atmosphère anaérobie, l'Anoxomat ®, pour établir une atmosphère dépourvue d'oxygène composée de 90% de N₂, 5% de CO₂ et 5% de H₂.

La culture doit se faire en aérobie et anaérobie et incubés à 37°C dans l'étuve.

5.1.4 Lecture des boites

Après incubation pendant 5 jours, l'observation des boites est effectuée. Si la culture est positive, cela signifie qu'il y a des colonies présentes dans la boîte.

Pour confirmer le genre des anaérobies présents dans la culture, il est nécessaire de procéder à la purification de chaque type de colonies observées. Cela peut être réalisé en effectuant des isolements séparés en anaérobiose et en aérobie.

5.2 Identification morphologique et biochimique des bactéries anaérobies

- **Coloration de Gram** : Les bactéries à Gram positif ont une paroi épaisse de peptidoglycane (colorées en violet) tandis que les bactéries à Gram négatif ont une paroi mince mais avec une membrane externe lipidique supplémentaire (colorée en rose).

Certaines bactéries ont une morphologie caractéristique reconnue à l'examen microscopique coloré au Gram, comme la présence d'extrémités bifidotermiales indiquant la présence de *Bifidobacterium* spp, et l'aspect fusiforme indiquant la présence de *Fusobacterium nucleatum*.

Voir les étapes de coloration de Gram en **annexe 10**.

- **Préparation des galeries miniaturisées API 20A et Rapide ID 32A**

Nous avons effectué d'abord une purification de la souche étudiée à partir d'une colonie de la culture précédente et l'ensemencer sur des boites de gélose Columbia au sang et incubé à 37°C pendant 48 heures.

Après 48 heures d'incubation, les microtubes des galeries sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.

Ensuite nous avons incubé la galerie API ® 20A à 37°C pendant 24 à 48 heures en anaérobiose et incubé la galerie Rapide ® ID 32A à 37°C pendant 4 à 5 heures en aérobiose.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

- Le mode opératoire de la préparation, d'inoculation et de la lecture des galeries miniaturisées API ® 20A et Rapide ID32® A, est donné en **annexe 11** et **annexe 12** respectivement.

5.3 Etude de sensibilité aux antibiotiques

Nous avons effectué la méthode de diffusion sur gélose et détermination des CMI par E- test, veuillez voir **l'annexe 13** pour la mode opératoire.



III. Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. Diagnostic bactériologique

1.1.1. Observation microscopique

La coloration de Gram des bactéries anaérobies révèle différentes formes par exemples :

1) *Actinomyces meyeri* est une bactérie à Gram positif non sporulé où on observe des bacilles polymorphes, corynéformes coloré en violet, peuvent se retrouver seuls ou par paires avec des arrangements en V, Y et en L [8] [Figure 8].



Figure 8: Visualisation au microscope optique de *Actinomyces meyeri* après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (photographie prise à l’Institut Pasteur)

2) *Bacteroides fragilis* est une bactérie à Gram négatif asporogène et immobiles se présentent sous forme de bâtonnets disposés seuls ou par paires et caractérisés par une coloration bipolaire [9] [Figure 9].



Figure 9 : Visualisation au microscope optique de *Bacteroides fragilis* après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (photographie prise à l’Institut Pasteur)

3) *Propionibacterium acnes* est une bactérie à Gram positif sous forme de bacilles corynéformes ou courte coccoides [8] [Figure10].



Figure 10 : Visualisation au microscope optique de *Propionibacterium acnes* après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (photographie prise à l’Institut Pasteur)

4) *Fusobacterium nucleatum* est un bacille à Gram négatif, non sporulé, ayant un aspect caractéristique de long bacille aux extrémités effilées [Figure11].



Figure 11 : Visualisation au microscope optique de *Fusobacterium nucleatum* après coloration de GRAM (Gr : X 1000) (photographie prise à l'Institut Pasteur)

1.1.2. Tests biochimiques : galeries miniaturisées d'identification

- **Lecture de la galerie API® 20 A après incubation**

Après 24 heures d'incubation et inoculation des galeries miniaturisée API® 20 A à 37°C et ajouts des réactifs on obtient les résultats des 'figures 12, 13 et 14) pour *Propionibacterium acnes*, *Bacteroides fragilis* et *Actinomyces meyeri*.

En examinant le répertoire analytique de la galerie API 20 A et en recherchant le code précédemment obtenu dans ce répertoire, il a été possible d'identifier les bactéries suspectées avec une grande précision.



Figure 12: Résultat de la galerie API® 20 A de *Propionibacterium acnes* (photographie prise à l'Institut Pasteur)



Figure 13 : Résultat de la galerie API® 20 A de *Bacteroides fragilis* (photographie prise à l’Institut Pasteur)

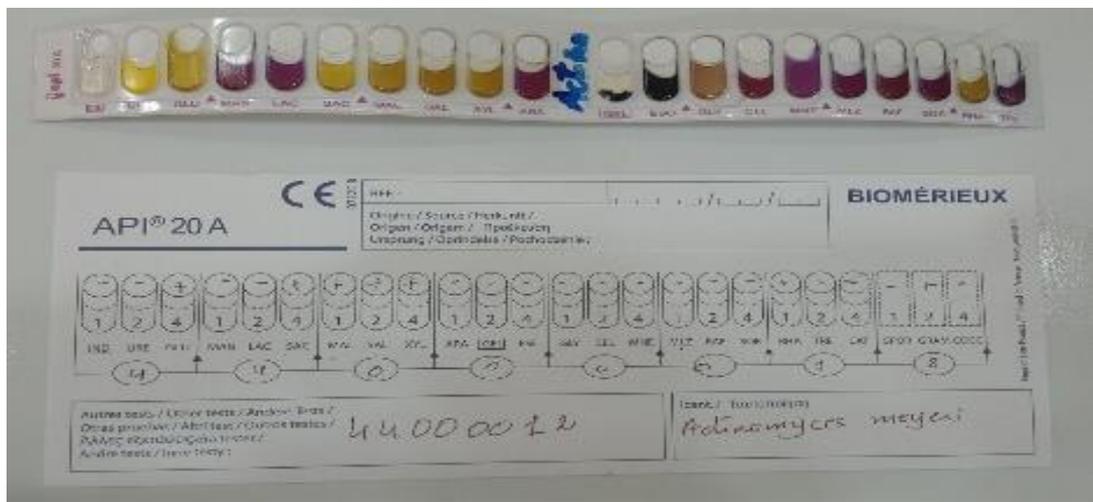


Figure 14 : résultat de la galerie API® 20 A d’*Actinomyces meyeri* (photographie prise à l’Institut Pasteur)

1.1.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La mesure des tailles des zones d’inhibition autour des disques d’antibiotiques et pour les bandelettes d’E-test a été effectuée pour évaluer la sensibilité des souches bactériennes détectées vis-à-vis de chaque antibiotique et selon les diamètres et les concentrations critiques (Annexe 14, 15,16).

- *Bacteriodes fragilis*

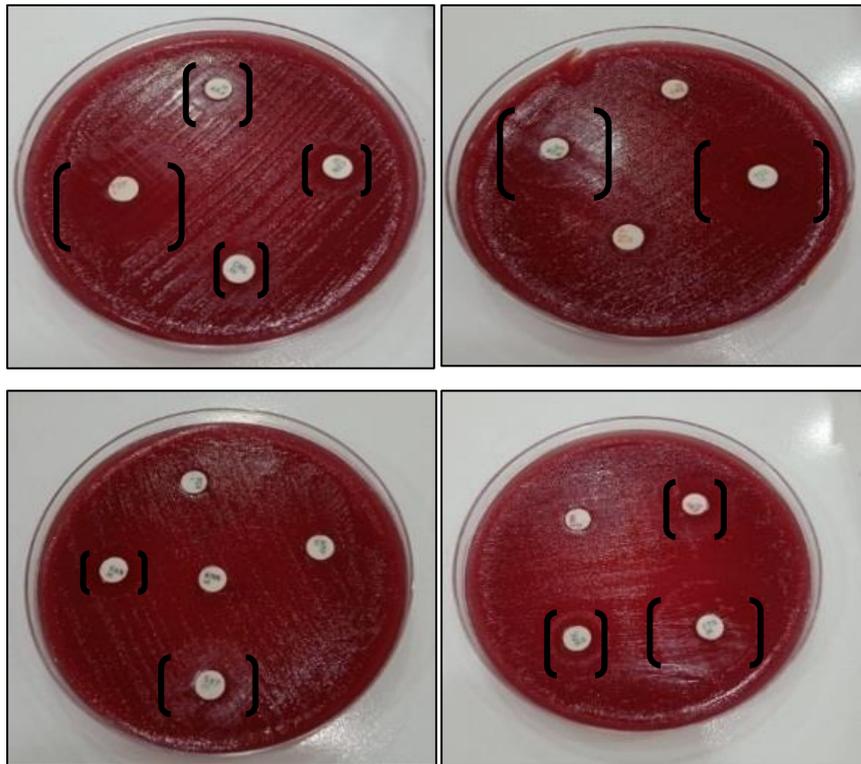


Figure 15 : Résultats d'antibiogramme et des CMI de *Bacteriodes fragilis* effectués au niveau du laboratoire des Bactéries Anaérobies et Botulisme de l'Institut Pasteur.

- *Propionibacterium acnes*

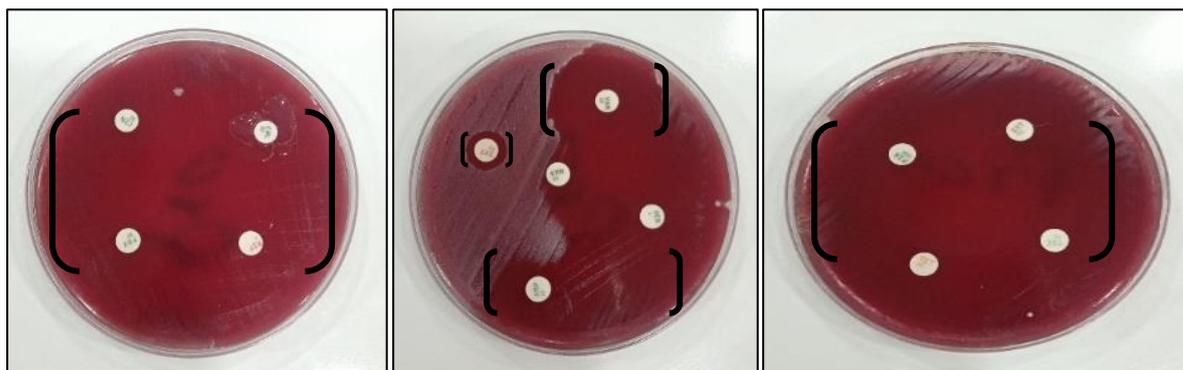


Figure 16 : Résultats d'antibiogramme de *Propionibacterium acnes* effectué au niveau du laboratoire des Bactéries Anaérobies et Botulisme de l'Institut Pasteur.

- *Actinomyces meyeri*

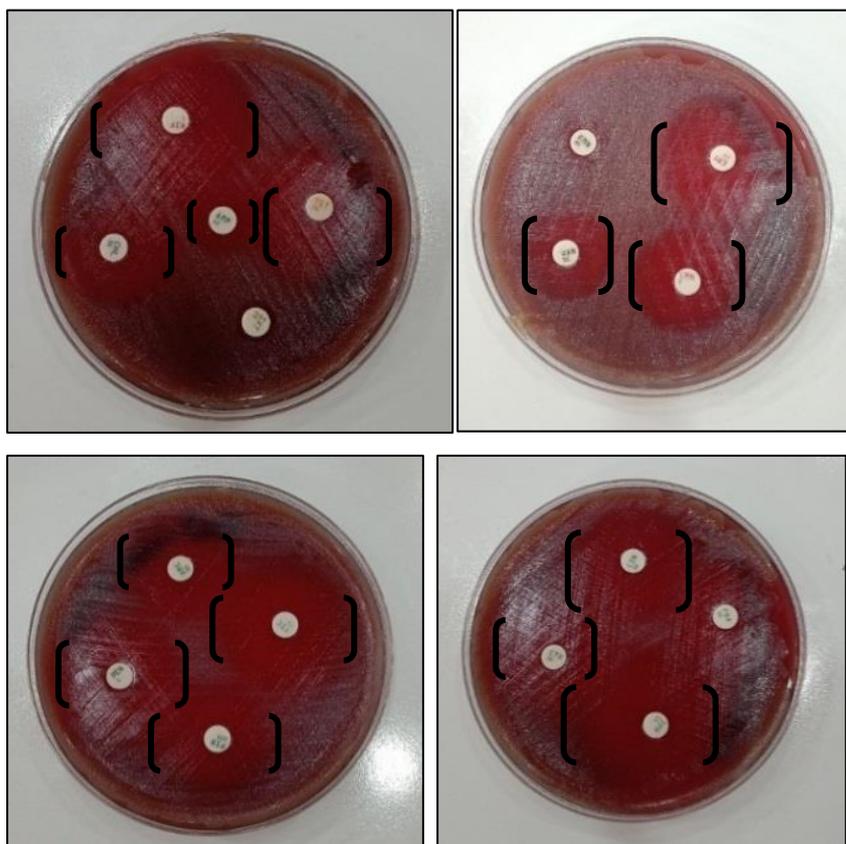


Figure 17 : Résultats d'antibiogramme d'*Actinomyces meyeri* effectué au niveau du laboratoire des Bactéries Anaérobies et botulisme de l'Institut Pasteur.

1.2. Etude rétrospective

1.2.1. Répartition totale des pourcentages des prélèvements positifs et négatifs des infections à bactéries anaérobies

Au sein du laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme IPA, et durant la période allant du 01 janvier 2018 au 30 avril 2023, un total de 207 prélèvements concernant les poches parodontale, liquides péritonéale, abcès cérébral, liquide synovial, liquide pleurale et abcès hépatique ont été reçus. Parmi eux, 80 se sont révélés positifs, représentant un taux de positivité de 38,65%. En revanche, 127 prélèvements, soit 61,35% étaient négatifs. (**Figure 18**)

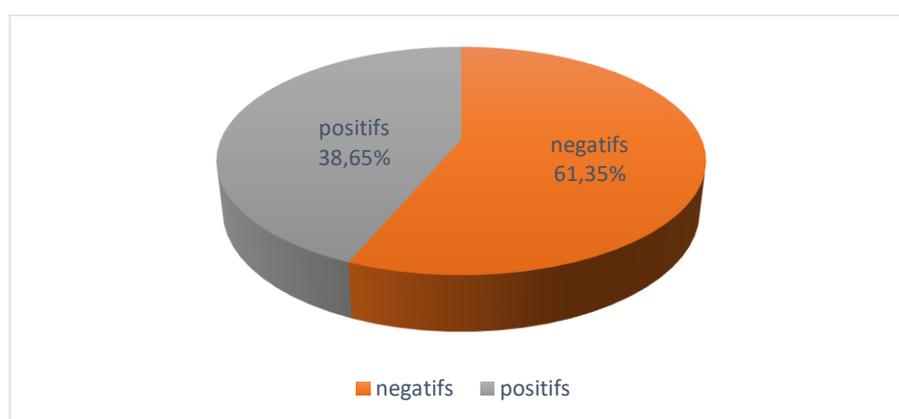


Figure 18 : Secteur graphique représentant les pourcentages des prélèvements positifs et négatifs des infections anaérobies entre 2018 et 2023 ($n = 207$)

1.2.2. Répartition du nombre des prélèvements totaux analysés en fonction des années

Les années qui ont enregistré les valeurs les plus élevées pour les prélèvements positifs sont les suivantes : (**Figure 19**)

- L'année précédente, en 2022, un total de 81 (39.13 %) prélèvements analysés.
- L'année 2021 a enregistré 79 (38.16%)prélèvements analysés.
- En 2019, 21 (10.14%) prélèvements ont été analysés.
- L'année 2018 a enregistré 13 (6.28%) prélèvements analysés.
- Quant à l'année 2020, a enregistré 9(4.35%) prélèvements analysés.
- En début de l'année 2023 ,4 (1.93%)prélèvements ont été analysés.

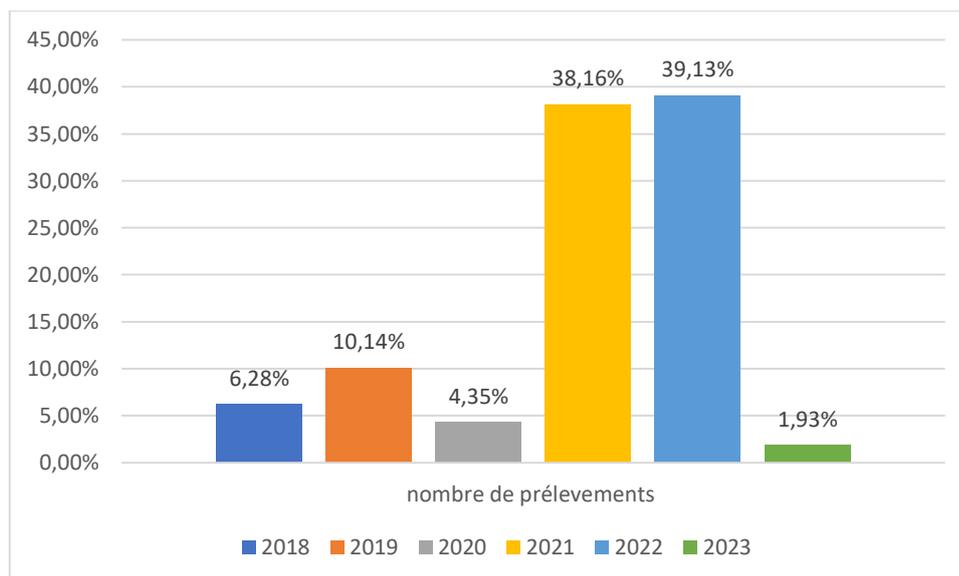


Figure19: Histogramme groupé du nombre des prélèvements analysés ainsi qu'au prélèvement positif en fonction des années entre 2018 et 2023 ($n = 207$)

1.2.3. Répartition du nombre des prélèvements en fonction de leurs types

Au cours de la période allant du 01 janvier 2018 au 30 avril 2023, on constate que les valeurs les plus élevées de prélèvements positifs sont les suivantes :

- Les prélèvements des poches parodontales sont les plus dominants, représentant un pourcentage de 69,56 % (144/207), suivis par liquide pleural 14,00 % (29/207) et les prélèvements des abcès cérébraux 10,14% (21/207).
- Les prélèvements des liquides péritoneaux et des abcès hépatiques comptent respectivement pour 3,38% (7/207) et 1,93% (4/207).
- Les prélèvements des liquides synoviaux représentent 0,96% (2/207) des cas. **(Figure 20)**

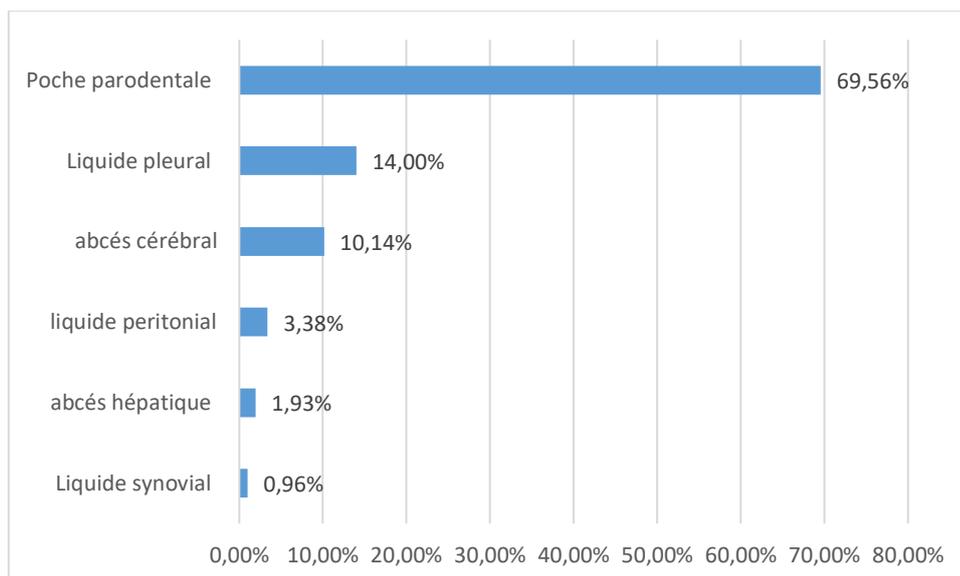


Figure20: Barre groupée du nombre de prélèvements en fonction de leurs types ($n = 207$)

1.2.4. Répartition des prélèvements négatifs en fonction de la prise préalable ou non d'un antibiotique

Au cours d'une période de 64 mois, 127 prélèvements négatifs ont été trouvés. Parmi ceux-ci, 51 prélèvements (soit 40,16%) ont été effectués sans traitement. En revanche, 76 prélèvements négatifs ont été réalisés après mise sous traitement, représentant ainsi un taux de 59,84%. (**Figure 21**)

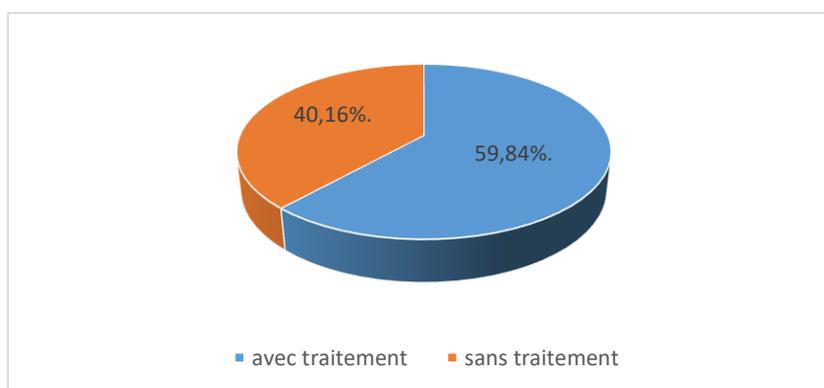


Figure21: Secteur graphique représentant la répartition des prélèvements négatifs en fonction de la prise préalable ou non de l'antibiotique ($n = 127$)

1.2.5. Répartition des prélèvements positifs analysés en fonction de l'âge

L'âge moyen de nos patients est de 46 ans, avec une médiane de 40 ans. La plage d'âge varie de moins d'un an (nouveau-né) à 98 ans, et en analysant la répartition des patients, nous constatons que les infections suppuratives prédominent chez : (**Figure 22**)

- Les patients entre 16 à 60 ans, représentant 90 % (72 /80) des cas.
- Tandis que les tranches d'âges plus jeunes (moins de 16 ans) représentent 6,25% (5/80) des cas.
- Les personnes âgées de plus de 60 ans présentent 3,75% (3/80) des infections.

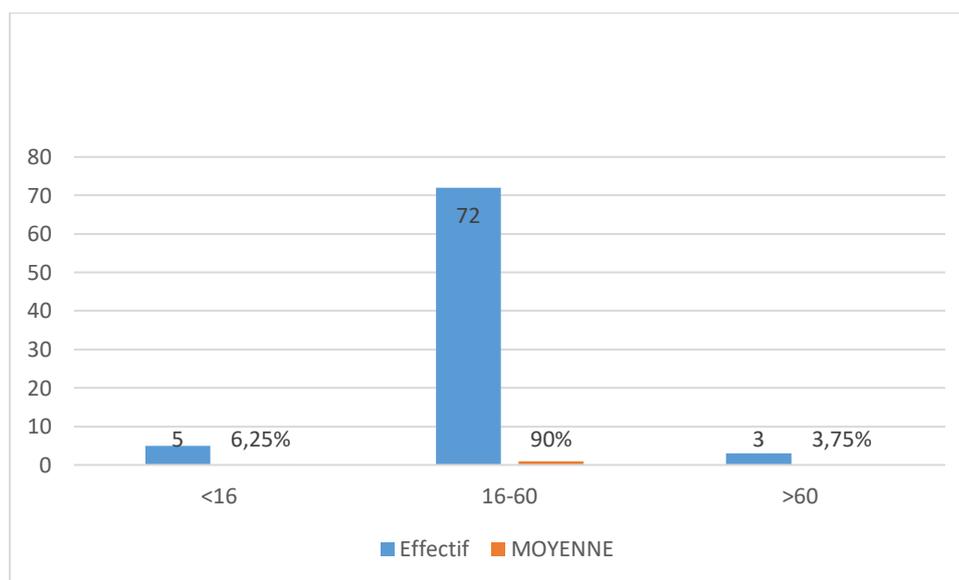


Figure 22 : Histogramme groupé du nombre de prélèvements positifs analysés en fonction d'âge ($n = 80$)

1.2.6. Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe

Parmi les 80 prélèvements positifs, une légère prédominance masculine a été constatée, avec 46 hommes représentant un pourcentage de 57,5%. En revanche, sur un reversé de 34 femmes, ce qui équivaut à un pourcentage de 42,5%, le sex-ratio H/F est de 1,35 (**Figure 23**).

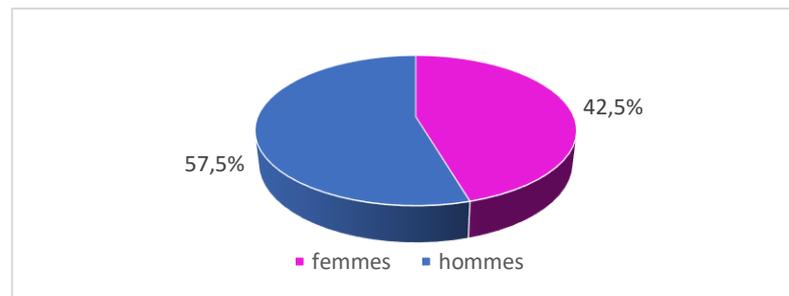


Figure23; Secteur graphique représentant la répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe ($n = 80$)

1.2.7. Répartition des bactéries anaérobies strictes isolées par genres

Le nombre total de souches isolées est de 146, provenant de 80 prélèvements positifs, ce qui correspond à une moyenne de 1,41 isolat par échantillon suppuratif. Ces souches se répartissent sur 7 genres différents. (**Figure 24**)

- En analysant la répartition par genre, on constate la prédominance de *Porphyromonas* (notamment *Porphyromonas gingivalis* et *Porphyromonas asaccharolytica*) représentant 43.15%, suivie par celles d'*Actinomyces* (telles que *Actinomyces odontolyticus* et *Actinomyces naeslundii*) avec un pourcentage de 28.08%.
- Ensuite, on observe le genre de *Prevotella* avec un pourcentage de 8.22% (comme *Prevotella oralis* et *Prevotella melaninogenica*).
- Enfin, les espèces de *Bacteroides* (par exemple, *Bacteroides fragilis*) sont présentes à un pourcentage de 6.16%.

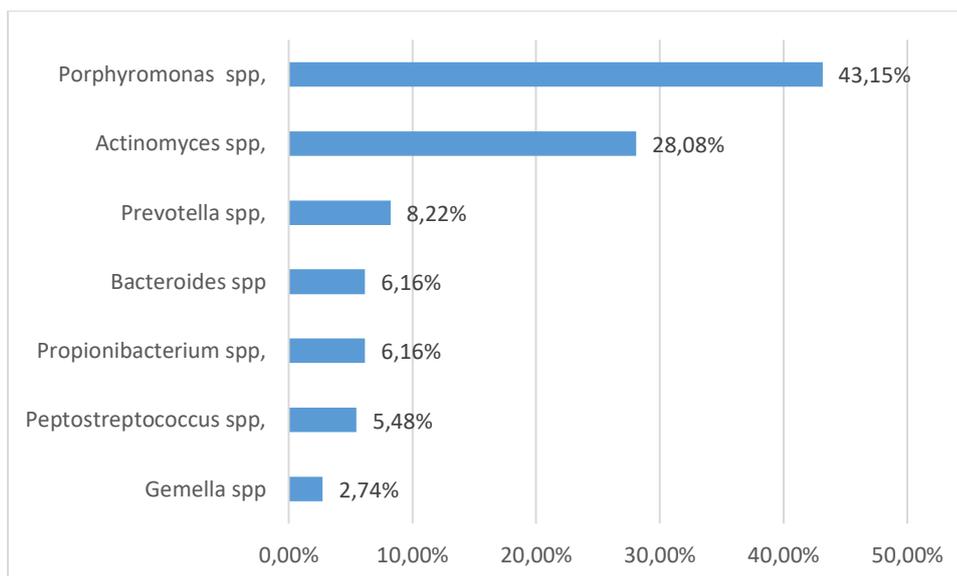


Figure 24: Barre groupée des bactéries isolées selon le genre bactérien ($n = 146$)

1.2.8. Résistance aux antibiotiques

Lors de l'étude rétrospective, on a identifié un total de 7 genres différents. Parmi ces derniers, nous avons choisis les plus isolés pour représenter leurs sensibilités aux antibiotiques : *Actinomyces* spp, *Bacteroides* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Porphyromonas* spp.

- **Taux de résistance de *Porphyromonas* :**

Nous avons effectué le test d'antibiogramme sur 18 souches de *Porphyromonas* :

- 4 souches résistantes à la pénicilline et ampicilline/amoxicilline.
- 6 souches résistante à l'érythromycine et la clindamycine, ainsi qu'une souche résiste à la tétracycline.
- Par contre toutes les souches présentent une sensibilité aux : Amoxicilline + Acide clavulanique, Ticarcilline, Pipéracilline, Céfazoline, Céfoxitine, Céfotaxime, Imipénème, Rifampicine et au Chloramphénicol.

- **Taux de résistance d'*Actinomyces* :**

Parmi les 6 souches étudiées, les espèces d'*Actinomyces* présentent une sensibilité aux bêtalactamines, les macrolides, la tétracycline et à la vancomycine.

- **Taux de résistance de *Bacteroides* :**

Nous avons réalisé le test d'antibiogramme sur 5 souches de *Bacteroides*, et la majorité d'elles se sont révélées résistantes à presque tous les antibiotiques, à l'exception du métronidazole, la rifampicine et au chloramphénicol.

Le nombre des souches résistantes observés sont les suivants :

- 3 souches résistent à la pénicilline et à l'ampicilline/amoxicilline
- Une souche résiste à : l'Amoxicilline + Acide clavulanique, la ticarcilline, piperacilline, céfazoline, céfoxitine, céfotaxime, imipénème et à la tétracycline

- **Taux de résistance de *Peptostreptococcus* :**

Parmi les 7 souches testées de *Peptostreptococcus* :

- 3 souches résistent à la clindamycine.
- 3 souches présentent une résistance à l'érythromycine.
- Une souche résiste à la ticarcylone.

2. Discussion

2.1. Identification bactériologique

Les infections profondes à Bactéries Anaérobies sont encore un problème de santé publique. La connaissance des agents pathogènes responsables de ces infections et de leurs sensibilités aux antibiotiques peut être utile dans le choix d'un traitement approprié.

Dans le laboratoire des bactéries anaérobies de l'Institut Pasteur, la détection des bactéries anaérobies débute par une identification macroscopique permettant d'observer certaines caractéristiques particulières de ces micro-organismes, telles que l'aspect, l'odeur et la couleur (par exemple pour le genre *Porphyromonas* on observe une pigmentation noir). Suivie d'identification microscopique qui est basée sur la coloration de Gram.

L'étape cruciale de ce processus d'identification consiste à utiliser des tests biochimiques, pour lesquels les galeries Rapide ID32 A ou API20A sont employées. Ces tests permettent d'obtenir des informations détaillées sur les caractéristiques biochimiques des bactéries anaérobies, facilitant ainsi leur identification précise.

Une fois la présence de bactéries anaérobies confirmée dans l'échantillon, il est essentiel de réaliser des tests de sensibilité aux antibiotiques. Ces tests permettent non seulement de surveiller le profil de résistance des bactéries, mais aussi de déterminer l'efficacité des antibiotiques spécifiques contre cette bactérie. Cette information est importante pour aider les médecins à choisir le traitement antibiotique le plus approprié et à assurer une prise en charge adéquate des patients atteints d'infections profondes. Dans ce but, un antibiogramme par méthode de diffusion en gélose et la détermination des CMI par E-test ont été effectués.

2.2. Etude rétrospective

Cette étude a eu pour objectif de caractériser le profil bactérien des infections purulentes au sein du laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme IPA (Institut Pasteur d'Algérie). De plus, elle a permis d'évaluer la sensibilité aux ATB des bactéries responsables de ces infections. Le choix de se focaliser sur le thème des infections profondes pour cette étude a été choisi en raison de leur gravité et de leur large variété clinique, notre étude a été limitée aux infections de poches parodontale, péritonite, abcès cérébral, infection articulaire, pleurésie et abcès hépatique.

2.2.1. Les prélèvements totaux des infections à bactéries anaérobies

Les résultats de l'étude démontrent que sur une période allant de Janvier 2018 à Avril 2023, 80 soit 38.65% des prélèvements réalisés ont été identifiés comme des infections à bactéries anaérobies strictes, cela indique qu'un peu plus d'un quart des prélèvements. D'autre part, le taux de cultures négatives est de 61.35% soit 127 prélèvements, ce qui signifie que la majorité des prélèvements ne présentaient pas de croissance bactérienne significative lors de la culture en laboratoire qui peut se lier à l'antibiothérapie préalable ce qui donne des résultats faussés négatifs. Ces résultats révèlent que les infections à bactéries anaérobies strictes représentent une proportion notable parmi les prélèvements analysés, ce qui souligne l'importance de surveiller et de gérer ces infections.

Le taux de positivité observé dans cette étude est moindre en comparaison avec les résultats obtenus dans d'autres recherches antérieures. Par exemple, une étude menée en 2020 au Département de Microbiologie de l'École de Médecine SMS en Inde, a révélé un taux global de positivité de 85,02%, soit 1902 prélèvements positifs sur un échantillon de 2237 patients [38]. De même, une étude menée à la faculté de médecine et à l'université de *Lumbini, Palpa*, Népal, a rapporté un taux de positivité de 64,7% sur 400 échantillons testés [36]. Cela peut être expliqué par les différentes populations étudiées et les facteurs de risques retrouvés dans chaque étude comme l'âge avancé, les pathologies tumorales ou les interventions chirurgicales, et noter que cette étude est menée sur une large variété d'infections, tandis que notre étude est bien limitée aux infections suivantes : poches parodontales, péritonites, abcès cérébraux, infections articulaires, pleurésies et abcès hépatiques.

Une autre étude réalisée en Chine a enregistré un taux de positivité de 64,46% sur 467 cas [36].

2.2.2. Les prélèvements positifs analysés en fonction des années

Cependant, il est intéressant de noter les années où les prélèvements positifs ont été plus fréquents, comme en 2021 pourraient être en corrélation avec la pandémie de COVID-19. Les surinfections bactériennes associées au COVID-19 sont les moins fréquentes, mais elles peuvent survenir chez certains patients, en particulier ceux qui ont une maladie sévère et prolongée. Les patients atteints de COVID-19 peuvent être plus vulnérables aux surinfections bactériennes en raison de l'affaiblissement de leur système immunitaire ou de l'utilisation préalable d'antibiotiques pour traiter des infections non virales [24].

2.2.3. Les prélèvements analysés en fonction de leurs types

Les prélèvements des poches parodontales, abcès cérébral et liquide pleural, sont les plus dominants ceci est dû à l'atmosphère favorable au développement des bactéries anaérobies dans ces localisations profondes et fermées.

En raison de la nature fermée des poches parodontales, ces infections peuvent être plus difficiles à traiter et peuvent persister plus longtemps. De plus, la présence de plaques dentaires et de débris alimentaires dans ces espaces fournit un substrat nutritif pour les bactéries anaérobies, contribuant ainsi à leur prolifération. Ces conditions favorables peuvent conduire à une augmentation des infections à Bactéries Anaérobies Strictes dans les poches parodontales, les espèces les plus trouvées sont *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella oralis*, *Actinomyces*, expliquant ainsi pourquoi ces prélèvements sont plus fréquemment positifs dans l'étude.

Les abcès cérébraux avec un taux 10.14 % sont des affections rares qui se développent généralement par proximité à partir d'une infection ORL (otite, sinusite, phlegmon de l'amygdale, etc.) ou dentaire. La contamination peut également se produire par voie hématogène à partir d'une source d'infection dans les poumons ou le tractus digestif. Lorsque l'infection a une origine bucco-pharyngée, *Bacteroides fragilis* est rarement impliqué. Les espèces les plus fréquemment retrouvées sont *Peptostreptococcus* et *Actinomyces* dans la plupart des cas, ces infections sont de nature mixte, impliquant à la fois des bactéries aérobies et anaérobies [25].

2.2.4. Les prélèvements analysés en fonction de l'âge et de sexe

La répartition spécifique des infections suppuratives en fonction des tranches d'âge des patients étudiés, indique que la majorité des cas d'infections profondes (90 %) ont été observées chez les patients âgés de 16 à 60 ans. Cette constatation suggère que cette tranche d'âge est particulièrement sujette à développer ce type d'infections et pourrait être liée à des facteurs tels que le mode de vie, l'exposition à des risques environnementaux et les conditions de santé spécifiques. Les patients âgés de moins de 16 ans représentent 6.25 % des cas d'infections profondes. Cette proportion relativement faible pourrait être attribuée à des facteurs tels que des mécanismes de défense immunitaire plus efficaces chez les enfants, une exposition moindre à certains agents pathogènes, et le fait que les enfants peuvent être plus susceptibles de développer d'autres types d'infections spécifiques à leur âge. Les personnes âgées de plus de 60 ans représentent 3.75% des cas d'infections profondes. Ils peuvent présenter des défenses immunitaires affaiblies et des conditions médicales sous-jacentes, ce qui pourrait les rendre plus vulnérables aux infections.

L'âge moyen enregistré dans notre travail (46 ans) est inférieur de celui rapporté par une étude au Maroc qui est 52 ans.

Une légère prédominance masculine a été constatée, avec une fréquence de 57.5% par rapport à 42.5% pour les hommes (rapport hommes/femmes =1.35).

Cependant, nos résultats sont un peu compatibles avec ceux de l'étude de **Hamid et al. (2020)** conduite au Soudan, où une prédominance masculine a été rapportée avec une sex-ratio H/F= 2,73[37]. Une autre étude menée en Espagne a rapporté une fréquence de 50,6 % pour les hommes, ce qui équivaut un sexe-ratio de 1,02. En revanche, nos résultats sont différents à ceux d'une étude réalisée en Inde, qui a montré une prédominance légèrement féminine (52,9%) avec un sexe-ratio H/F= 0.89 [36].

2.2.5. Les bactéries anaérobies strictes isolées par genre

Les infections anaérobies montrent une prédominance des bactéries à Gram négatif pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les BGN sont mieux adaptées à un environnement sans oxygène (anaérobie) comme les cavités profondes, les tissus nécrosés. De plus, la majorité des espèces de BGN font partie de la flore normale de l'organisme humain, résidant par exemple dans le tube digestif, le tractus génito-urinaire et les voies respiratoires. Ainsi, lorsque ces bactéries pénètrent des sites profonds du corps suite à une lésion, une chirurgie ou une rupture des barrières naturelles, elles peuvent causer des infections à bactéries anaérobies. Par ailleurs, les BGN sont spécifiquement associés à des maladies anaérobies telles que les abcès intra-abdominaux, les infections de la cavité buccale, les infections des voies respiratoires, les infections pelviennes et les infections post-chirurgicales. Il est important de noter que certains BGN anaérobies peuvent être plus résistants aux antibiotiques que d'autres types de bactéries, ce qui peut compliquer leur traitement et rendre les infections plus persistantes.

L'analyse de la répartition des isolats par genre révèle que les bactéries de genre *Porphyromonas* étaient les plus dominantes dans les échantillons étudiés, suivies par les *Actinomyces*, puis les *Prevotella*, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus* et enfin *Gemella*. Ces résultats sont proportionnels avec les pourcentages des différents types de prélèvements analysés, tels que les poches parodontales, les abcès cérébraux, les liquides pleuraux et péritonéaux.

En outre, il est important de noter que ces bactéries sont les plus fréquemment retrouvées dans ces différents types de prélèvements. Cependant, il convient de prendre en compte que la prédominance

des genres de bactéries peut varier en fonction de la nature spécifique de chaque infection, ainsi que de sa localisation.

La documentation médicale indique que les infections profondes sont généralement associées aux bactéries Gram-positives [36]. Cependant, cette prépondérance n'est pas constante à l'échelle mondiale, car des enquêtes récentes réagissent dans divers pays d'Afrique, d'Asie et d'Europe ont signalé que les bactéries Gram-négatives prédominent dans les infections suppuratives. Jusqu'à présent, les raisons de cette variation géographique restent floues. Cette possibilité pourrait être activée par des facteurs écologiques tels que le climat, les pratiques d'hygiène personnelle et la surveillance des infections nosocomiales [37].

2.2.6. Résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries devient de plus en plus importante dans le monde entier. L'évolution des bactéries vers la résistance ou même la polyrésistance aux antibiotiques, serait inéluctable parce qu'elle représente un aspect particulier de l'évolution générale des bactéries qui n'est pas stable. Les bactéries anaérobies strictes, présentent des résistances naturelles à certains antibiotiques tels que les aminosides et le sulfaméthoxazole, ce qui en fait des critères diagnostiques pour cette catégorie bactérienne.

Le genre *Porphyromonas* présente une résistance naturelle à la fosfomycine, vancomycine et aux polymyxines. Peu de résistances ont été décrites en Europe chez les différentes espèces de *Porphyromonas*. Seule la présence d'une bêta-lactamase de type CfxA a été décrite, Les études indiquent des taux de résistance très faibles pour l'amoxicilline, les associations pénicilline-inhibiteurs, la clindamycine et le métronidazole. Il convient toutefois de souligner que des résultats considérablement divergents ont été rapportés dans une étude menée en Colombie, où des taux de résistance de 20 à 25 % ont été observés pour l'amoxicilline, la clindamycine et en particulier le métronidazole [28].

Les bactéries du genre *Actinomyces* sont naturellement résistantes au métronidazole (absence du métabolisme ciblé), mais sont fortement sensibles aux aminopénicillines et aux bêtalactamines, aussi sensible à la vancomycine et la rifampicine, cette étude est similaire à celle qui a été faite en Belgique.

Le genre *Bacteroides*, et notamment le groupe *fragilis*, est le plus grand porteur de résistance chez les anaérobies. Ces bactéries étant fréquemment rencontrées en pratique clinique.

La présence d'une pénicillinase naturelle (*CepA*) est associée à la résistance aux aminopénicillines. Cette pénicillinase n'est cependant pas présente ou exprimée chez toutes les souches, et certaines souches peuvent donc avoir des concentrations minimales inhibitrices (CMI) sensibles [26]. La sensibilité des *Bacteroides* aux céphalosporines de 3e génération est considérée comme médiocre, et tout résultat sensible doit être considéré comme intermédiaire. Les antibiotiques fréquemment sensibles sur ces espèces sont le métronidazole, les associations pénicillines-inhibiteurs (contrairement aux associations céphalosporines inhibiteurs) l'adjonction de ce dernier ne suffisant pas à rattraper la faible affinité des premières pour les PLP], les carbapénèmes, la clindamycine, la tigécycline. De nombreux mécanismes de résistance peuvent être retrouvés chez *Bacteroides*. Le principal mécanisme de résistance à la céfoxitine est une diminution de l'affinité de certaines PLP à cette molécule, mais cette résistance peut aussi être imputable à un autre type de bêta-lactamase, *CfxA*, transportée par un élément génétique mobile [26,27]. La bêta-lactamase de type métalloprotéinase *CfiA* (aussi appelée *ccrA*) peut être responsable d'une perte d'activité de l'ensemble des bêta-lactamines, mais de nombreuses souches conservent une sensibilité aux carbapénèmes du fait d'une expression variable du gène en fonction de l'insertion d'un promoteur efficace en amont (élément d'insertion notamment) [26]. Une imperméabilité de la paroi peut être associée à chacun de ces mécanismes, renforçant la résistance et diminuant l'effet des inhibiteurs [28].

De nombreux types de gènes *nim* ont été mis en évidence chez des *Bacteroides*, portés soit par des plasmides, soit par des transposons. Ils entraînent une diminution de la sensibilité au métronidazole, mais d'autres mécanismes de résistance non-transmissibles à cet antibiotique sont aussi rencontrés [29].

Plusieurs gènes de résistance aux macrolides et apparentés ont été décrits chez *Bacteroides* (gènes *erm*, *linA*, *mefA*, *msrSA*), parfois retrouvés associés dans une même souche, et fréquemment responsables de résistances *in vitro*.

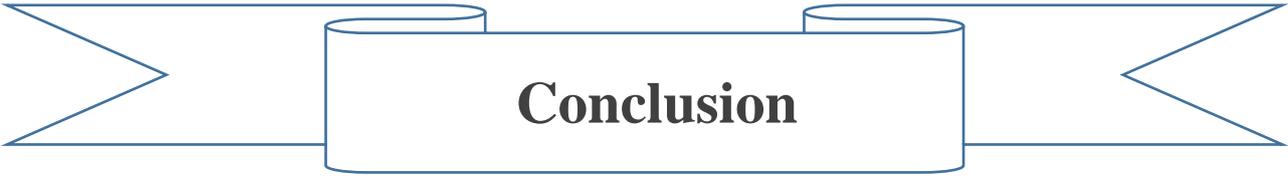
Le gène *tetQ* est responsable, quant à lui, de la majorité des résistances à la tigécycline observées, même si d'autres gènes ont été décrits [26].

Le *Bacteroides* du groupe *fragilis* constitue un des isolats le plus fréquent, il présente le plus fort taux de résistance confirmant les données de littérature. Le taux de résistance observé dans notre étude à l'association amoxicilline + acide clavulanique est supérieur aux données françaises, on observe une augmentation de résistance dans notre étude et d'autre recherche dans de nombreux pays (142), elle est liée à l'acquisition d'une séquence d'insertion (*IS1124*) en amont du gène *cepA* associée à des pertes de porines [40].

Les études récentes en Europe ont rapporté une résistance à la céfoxitin similaires à celle observée dans notre étude, par contre une proportion plus élevée a été retrouvée en Belgique [40].

D'autres études américaines, européennes et asiatiques rapportent une résistance aux carbapénèmes plus faible par rapport aux résultats de notre étude [40].

Pour le genre *Peptostreptococcus*, la résistance aux macrolides est déterminée par les gènes *erm*, le plus souvent par *ermTR*, les *Peptostreptococcus* sont généralement sensibles aux pénicillines, céphalosporines, aminopénicillines, carbapénèmes, clindamycines et métronidazoles [26].



Conclusion

Les bactéries anaérobies strictes sont fréquemment impliquées dans les infections profondes développées à partir des microbiotes endogènes. Au fil des décennies, leur classification a fait l'objet de révisions continues, ce qui a conduit à la description de nouvelles espèces et des changements de dénomination pour d'autres.

La mise en culture bactérienne permet un diagnostic de certitude des bactéries anaérobies strictes.

Les résultats de cette étude rétrospective étalée sur 5 ans nous a permis d'obtenir un pourcentage de 38.65 % (80) des prélèvements positifs des infections profondes à bactéries anaérobies à partir de 207 prélèvements récoltés.

Les principales infections étaient les infections de la poche parodontale (69.56 %), suivies par les infections pleuraux (14.00 %) et les abcès cérébraux (10.14 %).

Les bactéries anaérobies strictes isolées appartiennent essentiellement aux genres : *Porphyromonas* spp (43.15 %), suivie par les *Actinomyces* spp (28.08 %), puis *Prevotella* spp (8.22 %), *Bacteroides* spp (6.16 %), *Propionibacterium* spp (6.16 %), *Peptostreptococcus* spp (5.48 %), et enfin *Gemella* spp (2.74 %).

Le genre *Bacteroides*, et notamment le groupe *fragilis*, est le plus grand porteur de résistance chez les anaérobies.

L'émergence de ces souches nous oblige à intensifier la surveillance et l'amélioration de la qualité de la prise en charge des infections profondes, la réduction de la consommation des antibiotiques avec la recommandation de l'antibiotique adéquat, la sensibilisation pour les professionnels de santé ainsi que le public, l'application de mesures d'assainissement, d'hygiène et de prévention des infections peuvent être l'enjeu principal pour bien contrôler ces infections.

Perspectives :

- Élargir l'étude et varier les types d'infections (infections vaginal, infections sur matériel).
- Approfondir l'identification des bactéries par d'autres techniques comme la PCR.
- Elargir également l'étude sur des infections mixte Aérobie- Anaérobies.



Références bibliographiques

- [1] Amirouche Nada, Driouèche rayan, maazouz imen. (2021) recherche et identification des bactéries anaérobies stricte .université saad dahleb de blida
- [2] <http://coproweb.free.fr > gbearemi > anaer>
- [3] Pr.Gérard Lina et Pr.Jean Freney (2019).3 édition du Précis : Bactériologie clinique.Editions ESKA
- [4] Anaérobies, A. Decoster, FLM. p.2
- [5] Mathieu, D., Nevière, R., Chagnon, J. L., & Wattel, F. (1994). Les infections anaérobies des tissus mous. *Réanimation Urgences*, 3(4), 435-449.
- [6] <http://coproweb.free.fr/pagbac/bacanaer.htm>
- [7] Kienlen, J. (2003). Les infections à anaérobies. *Conférences d'actualisation*, 597-614.
- [8] A.Veillon, bactériologiste français (1864-1931)Veillon (flore endogène de), biotope
- [9] Bouskroui mohamed, Zouhair Said, Soraa Nabila, Benaouda Amina, Zerouali Khalid. (2017): guide pratique des bacétries pathogène p 87
- [10] Singer, E., Calvet, L., Mory, F., Muller, C., Chomarat, M., Bézian, M. C., & Dubreuil, L. (2008). Surveillance de la résistance aux antibiotiques des anaérobies stricts à Gram négatif. *Médecine et maladies infectieuses*, 38(5), 256-263.
- [11] Yousefi, Y., Meldrum, J., & Jan, A. H. (2020). Periodontal Abscess. StatPearls
- [12]<https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2669217-abces-definition-causes-traitements-pour-le-soigner-antibiotique-remede-naturel/>
- [13] <https://www.creapharma.ch/abces.htm>
- [14] Rahma Ziyad, Sebboua Roumaïssa. (2021) bacteriologie de la suppuration au CHU de constantine. Université des frères Mentouri constantine 1.
- [15] Regnault, L. (2015). Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies isolées d'hémocultures au CHU de Nancy en 2010 et en 2014 (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- [16] Dubreuil, L. (2003). Les infections à anaérobies et leur traitement : arguments microbiologiques. *Médecine thérapeutique*, 9(4), 147-155.
- [17]Mathieu, D., Nevière, R., Chagnon, J. L., & Wattel, F. (1994). Les infections anaérobies des tissus mous. *Réanimation Urgences*, 3(4), 435-449.
- [18] Joffin, J. N., & Leyral, G. (1998). *Microbiologie technique*. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine.
- [19] Descy, J., C. Meex, P. Melin, M.-P. Hayette, P. Huynen and P. De Mol (2010). "Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute." *Revue Médicale de Liège* 65(Suppl. Synthèse 2010).

[20] <https://microbiologie-clinique.com/antibiogramme.html>

[21] Joly-Guillou, M. L. (2006). Intérêt d'E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, 15(3), 237-240.

[22] Desplaces, N. (2014). Diagnostic microbiologique des infections ostéo-articulaires: les pièges à éviter. *Feuillets de Biologie*, 55(321), p6.

[23] Bonnet, R., Caron, F., Cavallo, J. D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., ... & Weber, P. (2013). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Recommandations*, 19, 133-142.

[24] HUSAIN, Maya, VALAYER, Simon, POEY, Nora, et al. Co-infections et surinfections bactériennes chez les patients hospitalisés pour COVID-19: une étude rétrospective monocentrique. 2020.

[25] Les infections à anaérobies J. Kienlen

[26] Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe* 2013; 21:43–9

[27] Sóki J, Gonzalez SM, Urbán E, et al. Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(11):2492–500

[28] Edwards R. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *J Med Microbiol* 1997; 46(12):979–86.

[29] Sóki J, Eitel Z, Urbán E, et al. Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41(2):122–5

[30] Fosse T, Madinier I, Hannoun L, et al. High prevalence of *cfxA* beta-lactamase in aminopenicillin-resistant *Prevotella* strains isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17(2):85–8.

[31] Sherrard LJ, McGrath SJ, McIlreavey L, et al. Production of extended-spectrum -lactamases and the potential indirect pathogenic role of *Prevotella* isolates from the cystic fibrosis respiratory microbiota. *Int J Antimicrob Agents* 2016;47(2):140-5.

[32] Sherrard LJ, Schaible B, Graham KA, et al. Mechanisms of reduced susceptibility and genotypic prediction of antibiotic resistance in *Prevotella* isolated from cystic fibrosis (CF) and non-CF patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(10):2690–8.

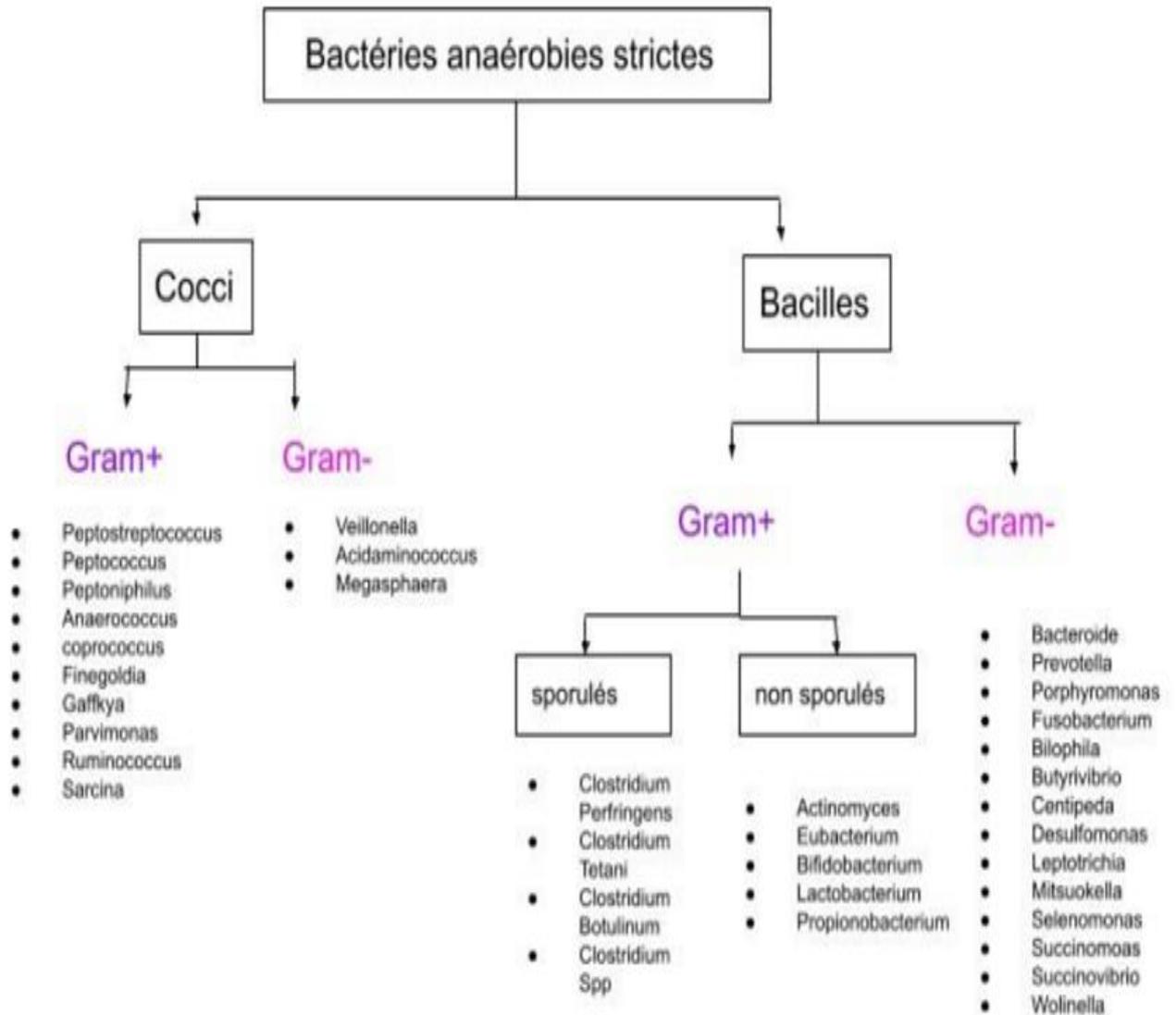
[33] Alauzet C, Mory F, Teyssier C, et al. *Ella baroniae*. Metronidazole resistance in *Prevotella* spp. and description of a new *nim* gene in *Prevotella baroniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1):60-4.

[34] Ross JI, Snelling AM, Eady EA, et al. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia. *Br J Dermatol* 2003; 144(2):339-46.

- [35] Furustrand Tabin U, Aubin GG, Eich G, et al. Occurrence and new mutations involved in rifampicin-resistant *Propionibacterium acnes* strains isolated from biofilm or device-related infections. *Anaerobe* 2015; 34:116–9
- [36] Maharjan, N., & Mahawal, B. S. (2020). Bacteriological profile of wound infection and antibiotic susceptibility pattern of various isolates in a tertiary care center. *Journal of Lumbini Medical College*, 8(2): 218-224
- [37] Xu, F., Kong, W., Peng, J., Gu, H., & Zheng, H. (2020). Analysis of main pathogenic bacteria and drug sensitivity in patients with chronic suppurative otitis media and middle ear cholesteatoma in China. *Biotechnology letters*, 42(8): 1559-1566.
- [38] Sharma, R., Batra, S., Balothia, V., & Agarwal, S. (2021). Bacteriological Profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Pus Culture Isolates from a Tertiary Care Hospital, SMS Medical College Jaipur. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 7(11) : 7502-7508.
- [39] EUCAST 2021 (Comité européen des tests de sensibilité aux agents antimicrobiens)
- [40] Loïc Regnault. (2018). Comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries anaérobies : 73-76



Annexe 1 : Schéma représentant la classification de principales bactéries anaérobies strictes [1]



Annexe 2 : Les anaérobies de la flore endogène (d'après SM. Finegold)

Peau

Propionibacterium acnes +++
Peptostreptococcus spp

Flore buccale

Prevotella pigmentées
Porphyromonas spp
Prevotella groupe *oralis*
Fusobacterium nucleatum
Peptostreptococcus spp
Eubacterium spp
Actinomyces spp

Flore vaginale

Lactobacillus : +++
Prevotella bivia, *P. disiens*
Prevotella pigmentées
Peptostreptococcus spp

Flore colique

Bacteroides groupe *fragilis* +++
Bilophila wadsworthia
Peptostreptococcus spp
Clostridium spp
Bifidobacterium spp
Eubacterium spp

+++ : germe dominant

Annexe 3 : Caractères d'identification des *Actinomyces* [18]

	<i>A.israelii</i>	<i>A.gerencseriae</i>	<i>A.naeslundii</i>	<i>A.odontolyticus</i>	<i>A.eyropaeus</i>
Catalase	-	-	V	-	-
Uréase	-	-	+	-	-
Nitrate réductase	V	V	V	+	-
Hydrolyse de l'esculine	+	+	+	V	V
b-hémolyse	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	V
Mannitol	V	+	-	-	-
Xylase	+	V	V	V	-
Mannasoe	+	+	+	-	V
Raffinose	+	+	+	-	-

- : absence ; + : présence ; V : variables

Annexe 4 : Caractères biochimique des bacilles gram positif [3]

	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Propionibacterium avidum</i>	<i>Propionibacterium granulasum</i>	<i>Pseudo-propionibacterium propionicum</i>
Catalase	+	+	+	0
Croissance optimale	ANA	ANA/A	ANA	ANA
Indole	+	0	0	0
Réduction des nitrates	+	0	0	+
Esculine en anaérobiose	0	+	0	0
Saccharose	0	+	+	+
Maltase	0	+	+	+
B-hémolyse	V	+	+	0

0 : absence ; + : présence ; V : variables ; ANA : anaérobie ; A : aérobie

Annexe 5 : Caractères biochimiques des bacilles à Gram négatif [18]

Les bactéries	Catalase	Urée	Indole	Esculine	Saccharose	Maltose	Glucose	Lactose	ribose	Manose	Cellobiose	fructose	arabinose	Xylose	Salicine	Tréhalose	Gélatinase
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	/	-	-	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Prevotella bivia</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	/	-	/	/	-	-	-	-	-
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	/	-	-	-	-	/

- : absence ; + : présence ; / : variables

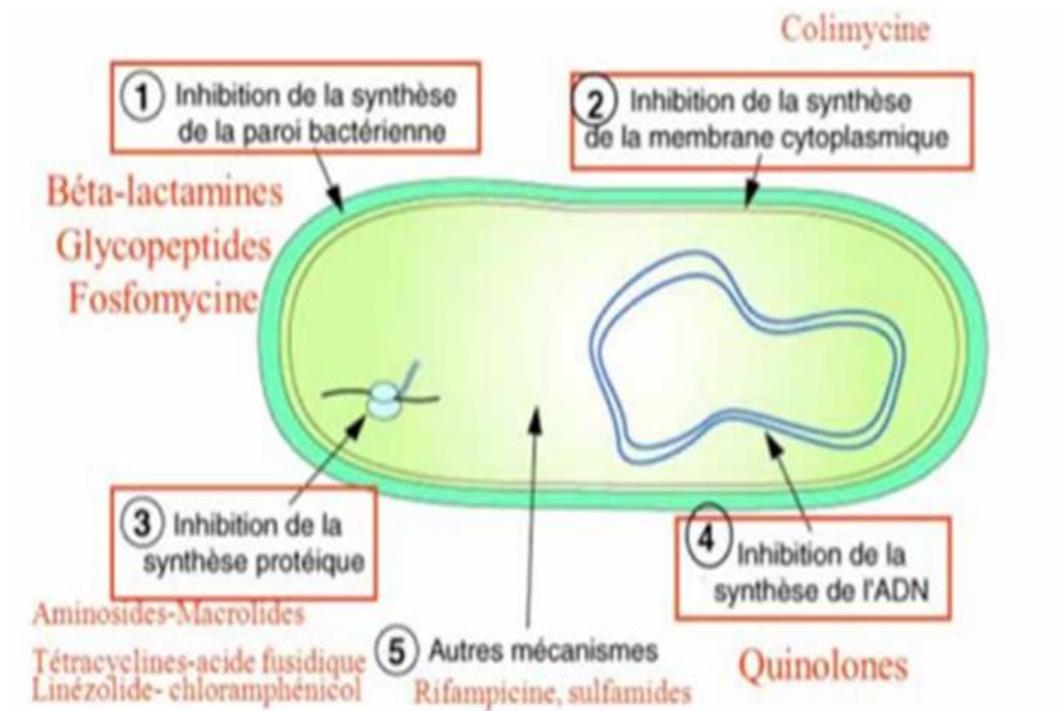
Annexe 6 : Liste des principales bactéries anaérobies souvent responsables des infections profondes [3]

Type des bactéries anaérobies	Genre	Espèces
Bacilles à Gram positif non sporulé	<i>Actinomyces</i>	<i>A. Israelii</i>
		<i>A. Georgiae</i>
		<i>A. Gerencseriae</i>
		<i>A. Meyeri</i>
		<i>A. Viscosus</i>
		<i>A. Naeslundii</i>
		<i>A. Neuii</i>
		<i>A. Odontolyticus</i>
		<i>A. Pyogenes</i>
		<i>A. Turicensis-radingae</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. Acidipropionici</i>
		<i>P. Acnes</i>
		<i>P. Australiense</i>
		<i>P. Avidum</i>
		<i>P. Cyclohexanicum</i>
		<i>P. Freudenreichii</i>
		<i>P. Granulosum</i>
		<i>P. Jensenii</i>
		<i>P. Microaerophilum</i>
		<i>P. Propionicum</i>
<i>P. Thoenii</i>		
		<i>B. Caccae</i>
		<i>B. Distasonis</i>

Bacilles à Gram négatif	Bacteroides	<i>B. Eggerthii</i>		
		<i>B. Fragilis</i>		
		<i>B. Galactunoricus</i>		
		<i>B. Ovatus</i>		
		<i>B. Streccoris</i>		
		<i>B. Thetaiotaomicron</i>		
		<i>B. Uniformis</i>		
		<i>B. Pneumosinte</i>		
		<i>B. Merdae</i>		
		<i>B. Vulgatus</i>		
		<i>B. Capillosus</i>		
		<i>B. Coagulans</i>		
		<i>B. Ureolyticus</i>		
	Prevotella	<i>Prevotella pigmentées</i>	<i>P. Denticola</i>	
			<i>P. Intermedia</i>	
			<i>P. Melaninogenica</i>	
			<i>P. Corporis</i>	
		<i>Prevotella non pigmentées</i>	<i>P. Buccae</i>	
			<i>P. Bivia</i>	
			<i>P. Disiens</i>	
			<i>P. Oralis</i>	
			<i>P. Oris</i>	
			<i>P. Veroralis</i>	
		Porphyromonas	<i>P. asaccharolytica</i>	
			<i>P. endodontalis</i>	
			<i>P. gingivalis</i>	
	Fusobacterium	<i>F. mortiferum</i>		
		<i>F. necrophorum</i>		
<i>F. nucleatum</i>				

		<i>F. varium</i>
Cocci à Gram positif	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
		<i>P. anaerobius</i>
		<i>P. spp</i>
	<i>Peptococcus</i>	<i>P. Niger</i>
	<i>Peptophilus</i>	<i>P. asaccharolyticus</i>
	<i>Gemella</i>	<i>G. morbillorum</i>
	<i>Mobilunicus</i>	<i>M. curtisii</i>
<i>M. mulieris</i>		
Cocci à Gram négatif	<i>Veillonella</i>	<i>V. parulva</i>

Annexe 7 : Principaux mécanismes d'action des antibiotiques. [11]



Annexe 8 : photographie d'un résultat d'une CMI effectuée [20]



Annexe 9 : Fiche de renseignement au niveau de laboratoire des Bactéries anaérobies de l'Institut Pasteur



Institut Pasteur d'Algérie
Laboratoire de Bactériologie Médicale
Et de surveillance de la résistance aux antibiotiques
Tel : 023 36 75 04 - Poste : 233



FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Code Permanent N° analyse

Nom : Prénom :
 (Nom de jeune fille pour les femmes mariées)

Date de naissance : Sexe :

Profession : Adresse personnelle : Wilaya :

Hospitalisé : Oui Non

Date d'admission : Motif d'hospitalisation :

Service : Hôpital : Wilaya :

Antécédents d'hospitalisation

Date de réception : Date du prélèvement : Heure : Nombre

Signes cliniques :

..... Date de début :

Antibiothérapie actuelle : Oui Non Date de début :

ATB1 : ATB2 :

ATB3 : ATB4 :

Antibiothérapie précédente Date de début :

Terrain particulier :

Traitement immunosuppresseur Grossesse Age gestationnel :

Gestes invasifs : Oui Non Date de début :

Sondage urinaire Intervention chirurgicale Type :

Cathétérisme artériel Intubation Autres :

URINES

HEMOCULTURE Nombre de flacons : Heure : Température :

PRELEVEMENTS DIVERS : Plaie Opératoire : Oui Non Localisation :

Autres Nature : Localisation :

MATERIEL : Cathéter Site d'insertion : Pus Réaction inflammatoire

Autres matériels Nature : Localisation :

PRELEVEMENTS GENTAUX : (à préciser) :

AUTRES : Souche à identifier

Demandes particulières :

Médecin prescripteur : Signature :

Annexe 10 : Mode opératoire de la coloration de Gram [12]

1- Préparation du frottis

- Prélever à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée 2 à 3 colonies bactériennes de la boîte de Pétri.
- Transférer ces colonies dans un tube à essai contenant 2 ml d'eau physiologique.
- Agitez le tube à l'aide d'un vortex pour obtenir une suspension bactérienne homogène.
- Préparez une lame propre et stérile.
- Déposer sur la lame une goutte de suspension bactérienne.
- Etaler la suspension du centre de la lame vers l'extérieur en mouvement circulaire.
- Laisser sécher la lame à l'air libre ou en déposant dans une armoire de séchage.
- Fixer le frottis en passant la lame à la flamme du bec bunsen (2 à 3 fois)

2- Coloration de Gram

- Recouvrir le frottis bactérien fixé avec quelques gouttes du violet de Gentiane et laisser agir pendant environ 1 minute.
- Jeter l'excès du colorant et rincer délicatement la lame à l'eau courante.
- Ajouter du Lugol (mordant) et laisser agir pendant environ 1 minute. Ensuite, jeter le colorant et rincer à nouveau à l'eau courante.
- Ajouter de l'alcool à 95° pendant quelques secondes (15 à 30 secondes) pour décolorer le frottis bactérien.
- Rincer à nouveau la lame à l'eau courante pour stopper la décoloration.
- Recolorer le frottis bactérien avec de la Fuchsine pendant 30 secondes à 1 minute.
- Rincer à l'eau du robinet pour éliminer l'excès de colorant.
- Sécher la lame avec un papier buvard
- pour passer à l'observation, placer la lame sur un microscope optique ajouter une goutte d'huile à immersion, et observer à un grossissement de x100.

Annexe 11 : Mode opératoire de la galerie API 20A [13]

A- Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure prélever à l'aide d'un écouvillon stérile quelques colonies obtenues sur gélose au sang en anaérobiose.
- Ouvrir l'ampoule d'API® Medium devant le bec bunsen.
- Tenir l'ampoule verticalement et émulsifier les germes en frottant l'écouvillon par rotations contre la paroi de l'ampoule tout en restant dans le milieu de suspension. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Avec un densitomètre mesurer régulièrement la densité optique de la suspension bactérienne pour obtenir une suspension d'une opacité finale de 3 McFarland.

B- préparation de la galerie

- Inscrire les références des souches sur la languette latérale de la boîte.
- Utiliser une pipette stérile munie d'une poire et inoculer délicatement et sans créer des bulles d'air chaque microtubule la galerie, en l'inclinant légèrement.
- ajouté l'huile de vaseline dans la cupule IND pour éviter l'évaporation de tryptophane.
- placer la galerieensemencée dans une jarre d'anaérobiose avec un régénérateur et fermer hermétiquement.
- Connecter la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobiose (Anoxomat®) et incuber à 37°C pendant 24-48h.

C - Après incubation

- Ajouter une goutte de réactif de Xylène et une goutte de Kovacs dans la cupule IND et lire dans les 5 minutes qui suivent, une réaction positive se traduira par l'apparition d'un anneau rouge à la surface de la suspension.
- Ajouter 1 à 2 gouttes de H₂O₂ à 3 % dans la cupule GLU ou dans n'importe quelle cupule ou le sucre est fermenté. L'apparition des bulles d'air indique une réaction positive (test de catalase).
- Ajouter une goutte d'indicateur coloré de pH dans tous les sucres : (où il y'a un doute de lecture), une coloration jaune ou vert-jaune indique une réaction positive qui doit être enregistrée sur la fiche de résultats.

D - Interprétation

- Détermination du profil numérique : utiliser la fiche de résultats qui contient une reproduction du schéma de la galerie API 20 A comprenant 20 tests, ainsi que la réaction de la catalase et 3 tests de morphologie : SPOR pour la présence de spores (+, -), GRAM pour le résultat du test Gram (+, -) et COCC pour la présence de cocci (+, -).
- Les tests sur la fiche de résultats sont regroupés par trois, et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chaque test, en additionnant les valeurs correspondant aux réactions positives à l'intérieur de chaque groupe, on obtient 8 chiffres qui constituent le profil numérique.

- A l'aide du Catalogue Analytique Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

api® 20 A

IVD

Système d'identification des bactéries anaérobies

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

Le système API 20 A permet de rechercher rapidement et facilement 21 caractères pour l'identification biochimique des bactéries anaérobies. D'autres caractères tels que croissance en gélose profonde, aspect des colonies, morphologie cellulaire, coloration de Gram... sont à rechercher et à intégrer dans la méthodologie utilisée pour pouvoir réaliser une identification complète. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'identification en fin de notice.

PRINCIPE

La galerie API 20 A comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests)

- 25 galeries API 20 A
- 25 boîtes d'incubation
- 25 ampoules d'API 20 A Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

COMPOSITION

Galerie

La composition de la galerie API 20 A est reportée dans le tableau de lecture de cette notice.

Milieu

API 20 A	Trypticase	5 g
Medium	Extrait de levure	5 g
4 ml	Chlorure de sodium	2,5 g
	L-tryptophane	0,2 g
	L-cystine	0,4 g
	Hémine (origine porcine)	0,005 g
	Vitamine K ₁	0,01 g
	Sulfite de sodium	0,1 g
	Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
	pH 6,9-7,3	

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs / Instrumentation

- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- Réactifs : BCP (Réf. 70 510)
EHR (Réf. 70 520)
XYL (Réf. 70 530)
- McFarland Standard (Réf. 70 900)
- Catalogue Analytique API 20 A (Réf. 20 390), logiciel d'identification **apiweb™** (Réf. 40 011), automate ATB™ ou **mini API** (consulter bioMérieux)
- Eau oxygénée sol. à 3 %

Matériel

- Ecouillons
- Pipettes ou PSlpettes
- Système d'anaérobiose
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Equipement général de laboratoire de bactériologie dont lampe UV (365 nm)

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle microbiologique.
- Pour usage professionnel uniquement.
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer, ne pas inhaler).
- Les prélèvements, cultures bactériennes et produits ensemencés doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI NCCLS M29-A, Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - Révision en vigueur", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage et des composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : capsule déformée, ...
- Ouvrir les ampoules délicatement comme suit :

- Placer l'ampoule dans le protège-ampoule.
- Tenir l'ensemble verticalement dans une main (bouchon blanc vers le haut).

Bien enfoncer le bouchon.

* Modèle 1 :

- Recouvrir la partie inclinée du bouchon avec la première phalange du pouce.
- Exercer une pression avec le pouce à la base de la partie inclinée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.

* Modèle 2 :

- Exercer une pression horizontale avec le pouce sur la partie striée du bouchon de façon à casser l'extrémité de l'ampoule.
- Retirer l'ampoule du protège-ampoule et conserver le protège-ampoule pour une utilisation ultérieure.
- Enlever délicatement le bouchon.

- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

API 20 A ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autre. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir l'ampoule d'API 20 A Medium comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation".
- A l'aide d'un écouillon, prélever toutes les colonies obtenues sur gélose au sang en anaérobiose. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Bien vérifier la pureté de la souche (éventuellement, réaliser une subculture à partir d'une colonie bien isolée).
- Tenir l'ampoule verticalement et émulsionner les germes en frottant l'écouillon par rotations contre la paroi de l'ampoule tout en restant dans le milieu de suspension. L'opacité finale doit être supérieure ou égale à celle de l'étalon 3 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément. Les bactéries à croissance lente peuvent nécessiter plusieurs boîtes de subculture pour obtenir l'inoculum de la densité requise.

NOTE : Pour maintenir une certaine anaérobiose, il convient d'éviter l'introduction d'air lors de l'homogénéisation du milieu.

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et réparer environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additifs ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire les références des souches sur la languette

latérale de la boîte. (Ne pas inscrire les références sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)

- Sortir une galerie API 20 A de son emballage et la déposer dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette stérile, inoculer la galerie avec API 20 A Medium ensemencé, en évitant la formation de bulles et en inclinant légèrement la galerie.
 - Pour le test [GEL], remplir tube et cupule.
 - Pour le test [IND], remplir seulement le tube avec API 20 A Medium et remplir la cupule avec de l'huile de paraffine, pour éviter l'évaporation de l'indole formé.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber 24 heures (± 2 heures) à 36°C ± 2°C, en chambre anaérobie, en jarre ou en sachet individuel.

- Le surplus d'API 20 A Medium peut servir à vérifier la pureté et la viabilité de la souche, en inoculant une gélose profonde ou un jeu de 2 boîtes de milieu de culture, incubées l'une en aérobiose, l'autre en anaérobiose.

LECTURE ET INTERPRETATION

Lecture de la galerie

Beaucoup de bactéries anaérobies donnent en 24 heures une réponse claire et facile à interpréter, mais certaines souches ont une croissance lente et ne sont identifiables qu'après 48 heures d'incubation.

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (ne nécessitant pas l'addition de réactifs).
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - Le BCP du milieu réactionnel peut être décoloré par réduction. Dans ce cas, révéler la réaction d'acidification en ajoutant 1 goutte de réactif BCP dans tous les microtubes contenant des carbohydrates. Une couleur **jaune** ou **vert-jaune** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test [IND] : ajouter 1 goutte de réactif XYL. Mélanger et attendre 2-3 minutes. Ajouter 1 goutte de réactif EHR. Le réactif doit rester à la surface du mélange xylène/huile de paraffine au niveau de la cupule (afin de ne pas diluer la coloration dans le microtube). Lire dans les 5 minutes qui suivent. Une couleur **rouge** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.
 - Test CAT : La production de catalase est mise en évidence après 30 minutes d'exposition des galeries à l'air libre. Ajouter 2 gouttes de H₂O₂ à 3 % dans un tube positif. L'apparition de **bulles** indique une réaction **positive** à noter sur la fiche de résultats.

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**.

- Détermination du profil numérique : La fiche de résultats reproduit le dessin de la galerie API 20 A avec ses 20 tests, plus la réaction de la catalase et 3 tests de morphologie : SPOR pour spore (+, -), GRAM (+, -) et COCC pour coccus (+, -). Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 8 chiffres qui constituent le profil numérique.
- Identification :

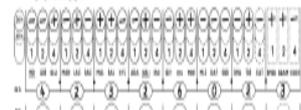
• Identification : Elle est réalisée à partir de la base de données (V 4.0)

* à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

* à l'aide de l'automate ATB™, du **mini API**, ou du logiciel d'identification **apiweb™** :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à 8 chiffres.



4 232 802 3 Clostridium septicum

CONTROLE DE QUALITE

Les milieux, galeries et réactifs font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche **1. Clostridium perfringens ATCC® 13124** de préférence ou l'une des souches suivantes :

2. *Bacteroides ovatus* ATCC 8483 3. *Clostridium sordellii* ATCC 9714

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	[GEL]	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
1.	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	++	-	++	-	+	-	-	V	-	+	-
2.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
3.	+	+	++	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Ce résultat peut varier en fonction du milieu de culture utilisé.

Profils obtenus après 24 heures d'incubation après culture sur gélose Columbia au sang de mouton.

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

LIMITES DU TEST

- Le système API 20 A est destiné à l'identification biochimique des bactéries anaérobies présentes dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice) et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

2968 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 89 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 5,8 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 5,2 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

- Fiche des résultats vierge pour la galerie API 20A :





REF: _____ / ____ / ____
 Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX


1
IND


2
URE


4
GLU


1
MAN


2
LAC


4
SAC


1
MAL


2
SAL


4
XYL


1
ARA


2
[GEL]


4
ESC


1
GLY


2
CEL


4
MNE


1
MLZ


2
RAF


4
SOR


1
RHA


2
TRE


4
CAT


1
SPOR


2
GRAM


4
COCC

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις δια tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση

Imprimé en France / Printed in France Réf. J040206

- Tableau de lecture :

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS			
				NEGATIVE	POSITIVE		
IND	L-tryptophane	0.98	INDole formation	<u>XYL - mix / 2-3 min + EHR / 5 min</u> yellow	red		
URE	urea	0.648	UREase	yellow-orange	red		
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (bovine origin)	1.96 1.96 1.96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	purple	yellow / yellow-green		
SAC	D-saccharose (sucrose)	1.86	acidification (SACcharose)				
MAL	D-maltose	1.96	acidification (MALtose)				
SAL	salicin	1.64	acidification (SALicin)				
XYL	D-xylose	1.64	acidification (XYLose)				
ARA	L-arabinose	1.64	acidification (ARABinose)				
[GEL]	gelatin (bovine origin)	0.6	hydrolysis (protease) (GELatin)	no diffusion of pigment (1)	diffusion of black pigment (1)		
ESC	esculin feric citrate	0.36 0.11	hydrolysis (β -glucosidase) (ESCulin)	yellow (2)	brown-black (2)		
				in UV (365 nm)			
				fluorescence	no fluorescence		
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycerol D-cellobiose D-mannose D-melezitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-trehalose	1.82 1.86 1.96 1.96 2.18 2.18 1.96 1.96	acidification (GLYcerol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MeLeZitose) acidification (RAFfinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAmnose) acidification (TREhalose)	purple	yellow / yellow-green		
CAT		-	CATalase			After 30 min in air <u>H₂O₂ in a positive tube</u> no bubbles	bubbles
SPOR		-	spores			absent	present
GRAM		-	Gram reaction			pink	violet
COCC		-	morphology			rod	coccus

Annexe 12 : Mode opératoire de la galerie ID32A [13]

A - Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture bactérienne pure prélever à l'aide d'un écouvillon stérile quelques colonies obtenues sur gélose au sang en anaérobiose.
- Ouvrir l'ampoule d'ID® Medium devant le bec bunsen.
- Tenir l'ampoule verticalement et émulsifier les germes en frottant l'écouvillon par rotations contre la paroi de l'ampoule tout en restant dans le milieu de suspension. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Avec un densitomètre mesurer régulièrement la densité optique de la suspension bactérienne Pour obtenir une suspension d'une opacité finale de 4 McFarland.

B - Inoculation de la galerie

- Sortir la galerie de son emballage.
- Inoculer la galerie en distribuant 55µl à l'aide d'une micropipette P200 dans chaque cupule et Recouvrir le test UREE avec 2 gouttes d'huile de paraffine.
- Mettre le couvercle sur la galerie.
- Incuber pendant 5 heures en aérobiose à 37°C.

C- Lecture de la galerie

Révéler toutes les réactions en ajoutant 1 goutte des réactifs suivants :

- FB (à partir du test PAL jusqu'au test SerA)
- kovacs dans la cupule IND
- réactif de GRIESS-ILOSVAY dans la cupule NIT
- réactif TRIS dans chacune des cupules : PAL, α -GAL, β -GUR et β -GAL

D- Identification

- Après lecture visuelle, le catalogue analytique est utilisé après avoir codé les réactions obtenues en un profil numérique.
- Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1,2 ou 4 est indiquée pour chacun : on additionne à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives.
- Les 24 premiers tests (partie gauche de la galerie) permettent d'obtenir un profil à 8 chiffres, en associant les 4 chiffres de la rangée supérieure (1) aux 4 chiffres de la rangée inférieure (0).
- Les 5 autres tests (partie droite) sont des tests complémentaires utilisés sur indication du catalogue Analytique en cas de faible discrimination.

rapid ID 32 A

Système d'identification des bactéries anaérobies

INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

rapid ID 32 A est un système standardisé pour l'identification des bactéries anaérobies en 4 heures, comprenant 29 tests enzymatiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification en fin de notice. La lecture et l'interprétation sont automatiques ou manuelles.

PRINCIPE

La galerie rapid ID 32 A comporte 32 cupules, dont 29 sont utilisées comme cupules tests et contiennent un milieu réactionnel déshydraté. Après 4 heures d'incubation en **aérobiose**, les réactions sont lues soit avec les instruments ATB™ Expression™ ou **mini API**®, soit visuellement. L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

PRESENTATION (coffret de 25 tests) :

- 25 galeries rapid ID 32 A
- 25 couvercles d'incubation
- 1 notice

COMPOSITION DE LA GALERIE

La composition de la galerie rapid ID 32 A est reportée dans le Tableau de Lecture de cette notice

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS**Réactifs / Instrumentation**

- API Suspension Medium, 2 ml (Réf. 70 700) ou 3 ml (Réf. 70 640) si utilisation de l'inoculateur ATB
- Réactifs : JAMES (Réf. 70 542)
NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442)
FB (Réf. 70 562)
- Huile de paraffine (Réf. 70 100)
- DENSIMAT (Réf. 99 234) ou Densitomètre ATB ou McFarland Standard (Réf. 70 900), point 4
- ATB Expression ou **mini API** et/ou logiciel d'identification **apiweb**™ (Réf. 40 011) (consulter bioMérieux)
- Pipette Electronique ATB (consulter bioMérieux) ou Inoculateur ATB et Embouts (Réf. 15 710)

Matériel

- Ecouvillons
- Pipettes ou PSlpettes
- Portoir pour ampoules
- Protège-ampoule
- Jarre anaérobie + générateur d'anaérobiose
- Géloses au sang fraîchement préparées (géloses à base Columbia de sang de cheval ou mouton, additionnées éventuellement de vitamine K3, en particulier si une bactérie du groupe des bactéries anaérobies pigmentées en noir est suspectée).
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

PRECAUTIONS D'UTILISATION

- **Pour diagnostic *in vitro* et pour contrôle micro-biologique.**
- **Pour usage professionnel uniquement.**
- Ce coffret contient des composants d'origine animale. La maîtrise de l'origine et/ou de l'état sanitaire des animaux ne pouvant garantir de façon absolue que ces produits ne contiennent aucun agent pathogène transmissible, il est recommandé de les manipuler avec les précautions d'usage relatives aux produits potentiellement infectieux (ne pas ingérer; ne pas inhaler).
- Les prélèvements et cultures bactériennes doivent être considérés comme potentiellement infectieux et doivent être manipulés de façon appropriée par un personnel compétent et averti. Les techniques aseptiques et les précautions usuelles de manipulation pour le groupe bactérien étudié doivent être respectées tout au long de la manipulation ; se référer à "CLSI/NCCLS M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; Approved Guideline - Révision en vigueur*". Pour informations complémentaires sur les précautions de manipulation, se référer à "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH - Dernière édition", ou à la réglementation en vigueur dans le pays d'utilisation.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- Avant utilisation, s'assurer de l'intégrité de l'emballage des différents composants.
- Ne pas utiliser de galeries ayant subi une altération physique : cupule déformée, sachet déshydratant ouvert, ...
- Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.
- L'interprétation des résultats du test doit être faite en tenant compte du contexte clinique ou autre, de l'origine du prélèvement, des aspects macro et microscopiques de la souche et éventuellement des résultats d'autres tests, en particulier de l'antibiogramme.

CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries se conservent à 2-8°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)

rapid ID 32 A ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.

MODE OPERATOIRE**Sélection des colonies**

- A partir d'une colonie bien isolée, faire une subculture sur gélose au sang fraîchement coulée (gélose à base Columbia + 5 % de sang de cheval ou de mouton, additionnée éventuellement de vitamine K3, en particulier si une bactérie du groupe des bactéries anaérobies pigmentées en noir est suspectée).
- Incuber de préférence 24 heures à 36°C ± 2°C en anaérobiose.

Préparation de la galerie

- Sortir la galerie de son emballage.
- Jeter le sachet de déshydratant.
- Mettre le couvercle.
- Inscire la référence de la souche sur la languette latérale de la galerie. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API® Suspension Medium, 2 ml (3 ml si utilisation de l'inoculateur ATB™) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant de l'eau distillée stérile sans additif.
- A l'aide d'un écouvillon, prélever la culture sur gélose au sang. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Préparer une suspension d'opacité égale à 4 de McFarland : mesurer avec le Densitomètre ATB (diode n° 30) ou avec le DENSIMAT ou évaluer par comparaison à un témoin d'opacité (McFarland Standard). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : En cas de lecture AUTOMATIQUE de la galerie, utiliser IMPERATIVEMENT le Densitomètre ATB ou le DENSIMAT pour ajuster l'opacité de la suspension bactérienne.

Inoculation de la galerie

- Inoculation AUTOMATIQUE :
 - Déposer sur un portoir de l'inoculateur ATB, la galerie, l'ampoule d'API Suspension Mediumensemencée et l'Embout.
 - L'inoculateur va réaliser automatiquement l'homogénéisation de l'ampoule et le remplissage des cupules (55 µl / cupule).
- Inoculation MANUELLE :
 - Homogénéiser l'ampoule d'API Suspension Mediumensemencée et inoculer la galerie en distribuant 55 µl de suspension par cupule avec la Pipette Electronique ATB.
- Recouvrir le test URE avec 2 gouttes d'huile de paraffine (cupule 1.0).
- Mettre le couvercle sur la galerie
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 4 H - 4 H 30 en **aérobiose**.

LECTURE ET INTERPRETATION**Lecture de la galerie**

Révéler toutes les réactions de la rangée 0 en ajoutant 1 goutte des réactifs suivants :

- Test NIT (cupule 0.0) : réactifs NIT 1 et NIT 2.
- Test IND (cupule 0.1) : réactif JAMES.
- Tests PAL à SerA (cupules 0.2 à 0.E) : réactif FB.

Lire après 5 minutes (sans excéder 10 minutes) :

- Lecture AUTOMATIQUE avec ATB Expression™ ou *mini API* :
 - vérifier la propreté de la partie centrale de la galerie, afin de permettre la reconnaissance du code de la galerie par le lecteur,
 - vérifier la concordance entre l'intitulé imprimé sur la galerie et l'intitulé de la galerie proposé par le logiciel. Le lecteur enregistre la couleur pour chaque cupule et transmet les données à l'ordinateur.
- Lecture VISUELLE :
 - se reporter au Tableau de Lecture. Noter les résultats sur la fiche de résultats.

NOTE : Selon les lots, il peut être observé pour certaines espèces bactériennes une légère variation dans la nuance et l'intensité de la coloration de la réaction.

Interprétation

L'identification est obtenue à partir de la base de données (V3 2) :

- APRES LECTURE AUTOMATIQUE :
 - les résultats transmis à l'ordinateur sont interprétés par le logiciel d'identification d'ATB Expression ou de *mini API*.
 - APRES LECTURE VISUELLE :
 - les réactions obtenues sont codées en un **profil numérique** :
 - Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun : on additionne à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives.
- L'identification est obtenue avec le logiciel d'identification *apiweb*™, en entrant manuellement au clavier le profil numérique à 10 chiffres : les 4 chiffres de la rangée supérieure gauche (1.0 à 1.B), suivis des 4 chiffres de la rangée inférieure gauche (0.0 à 0.B), suivis enfin des 2 chiffres des tests complémentaires :
- 9° chiffre pour le codage des tests GDC, αFUC (1.C, 1.D)
 - 10° chiffre pour HisA, GGA, SerA (0.C, 0.D, 0.E).



2103 3306 04 *Propionibacterium acnes*

CONTROLE DE QUALITE

Les galeries font l'objet de contrôles de qualité systématiques aux différentes étapes de leur fabrication. Un contrôle bactériologique des tests de la galerie est de plus réalisable par l'utilisateur avec la souche

1. *Capnocytophaga sputigena* ATCC® 33612 (*) de préférence ou l'une des souches suivantes :

- | | | | |
|----------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| 2. <i>Clostridium sordellii</i> | ATCC 9714 | 4. <i>Actinomyces viscosus</i> | ATCC 15987 |
| 3. <i>Clostridium sporogenes</i> | ATCC 19404 | 5. <i>Bacteroides fragilis</i> | ATCC 23745 |

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA

UBI	ADH	UGAL	BGAZ	BGP	αGLU	βGLU	αARA	βGUR	αNAG	MPH	RAF	COC	αFUC	TRT	IND	PAL	ArgA	ProA	UGA	ThaA	LeuA	PyrA	TyrA	AlaA	GlyA	HisA	CGA	SerA
1.	-	V	V	+	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
2.	+	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	-	+	-	-	-	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
4.	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	V	-	-	-	-
5.	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	V	-	+	V	+	-	V	+	-	-	+	-

Profils obtenus après culture des souches sur gélose Columbia au sang de mouton, en lecture automatique.

(*) *Capnocytophaga sputigena* identifié à *Capnocytophaga* spp sur rapid ID 32 A

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en oeuvre conformément à la législation locale en vigueur.

RECOMMANDATIONS

Pour obtenir les meilleurs résultats avec la galerie rapid ID 32 A, respecter scrupuleusement les points suivants de la méthodologie :

- Vérifier que la bactérie à identifier possède les caractéristiques générales des germes anaérobies (tests morphologiques, catalase, absence de croissance en aérobiose ...).
- Utiliser le milieu d'inoculation recommandé dans la présente notice (gélose Columbia au sang).
- Ajuster précisément l'inoculum à 4 de McFarland et utiliser impérativement le Densitomètre ATB ou le DENSIMAT lorsque la galerie est lue et interprétée avec les instruments ATB™ Expression™ ou mini API®.
- Délivrer exactement 55 µl par cupule avec la Pipette Electronique ATB ou l'Inoculateur ATB (impératif si la galerie est lue et interprétée avec ATB Expression ou mini API).
- Respecter le temps d'incubation et le temps de lecture.
- Veiller à la qualité des réactifs : surveiller la date de péremption, les conditions de conservation et ne pas dépasser 1 mois après ouverture des ampoules.

LIMITES DU TEST

- Le système rapid ID 32 A est destiné à l'identification des espèces mentionnées dans la base de données (voir Tableau d'Identification en fin de notice), et à elles seules. Il ne peut être utilisé pour identifier d'autres microorganismes ou exclure leur présence.
- Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées.

RESULTATS ATTENDUS

Se référer au Tableau d'Identification en fin de cette notice pour les résultats attendus des différentes réactions biochimiques.

PERFORMANCES

3013 souches de diverses origines et souches de collection appartenant aux espèces de la base de données ont été testées :

- 93,96 % des souches ont été correctement identifiées (avec ou sans tests complémentaires).
- 4,22 % des souches n'ont pas été identifiées.
- 1,83 % des souches ont été mal identifiées.

ELIMINATION DES DECHETS

Eliminer les réactifs utilisés ou non utilisés ainsi que les matériels à usage unique contaminés en suivant les procédures relatives aux produits infectieux ou potentiellement infectieux.

Il incombe à chaque laboratoire de gérer les déchets et les effluents qu'il produit selon leur nature et leur dangerosité, et d'en assurer (ou faire assurer) le traitement et l'élimination selon les réglementations applicables.

TABLEAU DE LECTURE

CUPULE	TEST	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTAT	
					NEGATIF	POSITIF
1.0	URE	urée	0,96	UREase	jaune	rouge
1.1	ADH	L-arginine	0,77	Arginine DiHydrolase		
1.2	αGAL	4-nitrophényl-αD-galactopyranoside	0,026	α-GALactosidase	incolor	jaune
1.3	βGAL	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,052	β-GALactosidase		
1.4	βGP	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside-6-phosphate-2CHA	0,034	β Phosphate		
1.5	αGLU	4-nitrophényl-αD-glucopyranoside	0,026	α-GLUCosidase		
1.6	βGLU	4-nitrophényl-βD-glucopyranoside	0,026	β-GLUCosidase		
1.7	αARA	4-nitrophényl-α-L-arabinofuropyranoside	0,024	α-ARABinosidase		
1.8	βGUR	4-nitrophényl-βD-glucuronide	0,026	β-GlucURonidase		
1.9	βNAG	4-nitrophényl-N-acétyl-βD-glucosaminide	0,028	N-Acétyl-β-Glucosaminidase		
1.A	MNE	D-mannose	0,56	Fermentation de MaNosE		
1.B	RAF	D-raffinose	0,56	Fermentation de RAFfinose		
1.C	GDC	acide glutamique	0,056	Ac. Glutamique DéCarboxylase	jaune-vert	bleu
1.D	αFUC	4-nitrophényl-αL-fucopyranoside	0,024	α-FUCosidase	incolor	jaune
1.E	-	cupule vide	-	cupule vide	-	-
1.F	-	cupule vide	-	cupule vide	-	-
0.0	NIT	potassium nitrate	0,14	Réduction des NiTrates	NIT 1 + NIT 2 / 5 min < 10 min incolor rouge	
0.1	IND	L-tryptophane	0,056	Production d'INDole	JAMES / 5 min < 10 min incolor rose	
0.2	PAL	2-naphtyl-phosphate	0,04	Phosphatase ALcaline	FB / 5 min < 10 min incolor pourpre	
0.3	ArgA	L-arginine-β-naphtylamide	0,050	Arginine Arylamidase	incolor orange pâle	
0.4	ProA	L-proline-β-naphtylamide	0,048	Proline Arylamidase		
0.5	LGA	L-leucyl-L-glycine-β-naphtylamide	0,052	Leucyl Glycine Arylamidase		
0.6	PheA	L-phenylalanine-β-naphtylamide	0,048	Phenylalanine Arylamidase		
0.7	LeuA	L-leucine-β-naphtylamide	0,052	Leucine Arylamidase		
0.8	PyrA	acide pyroglutamique β-naphtylamide	0,044	Ac. Pyroglutamique Arylamidase		
0.9	TyrA	L-tyrosine-β-naphtylamide	0,052	Tyrosine Arylamidase		
0.A	AlaA	L-alanyl-L-alanine-β-naphtylamide	0,048	Alanine Arylamidase		
0.B	GlyA	L-glycine-β-naphtylamide	0,04	Glycine Arylamidase		
0.C	HisA	L-hisidine-β-naphtylamide	0,048	Histidine Arylamidase		
0.D	GGA	acide L-glutamyl-L-glutamique β naphtylamide	0,068	Glutamyl ac. Glutamique Arylamidase		
0.E	SerA	L-serine-β-naphtylamide	0,04	Serine Arylamidase		
0.F	-	cupule vide	-	cupule vide	-	-

- Les quantités indiquées peuvent être ajustées en fonction des titres des matières premières.
- Certaines cupules contiennent des composants d'origine animale, notamment des peptones.

METHODOLOGIE	p. I
TABLEAU D'IDENTIFICATION	p. II
BIBLIOGRAPHIE	p. IV
TABLE DES SYMBOLES	p. V
FICHE DE RESULTATS	p. VI

ATCC est une marque utilisée, déposée et/ou enregistrée appartenant à American Type Culture Collection.

• Fiche des résultats vierge pour la galerie Rapide ID 32 :

rapidID 32A		URE	ADH	αGAL	βGAL	βGP	αGLU	βGLU	αARA	βGUR	βNAG	MNE	RAF	—	GDC	αFUC	—	
	(1)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	—	C	D	E	F
(0)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		NIT	IND	PAL	ArgA	ProA	LGA	PheA	LeuA	PyrA	TyrA	AlaA	GlyA	—	HisA	GGA	SerA	—

Annexe 13 : Mode opératoire d'un test de sensibilité aux antibiotiques par méthode de diffusion sur gélose et CMI par E-test [23]

1- Préparation de l'inoculum

- A l'aide d'un écouvillon prélever quelques colonies à partir d'une culture bactérienne jeune et pure.
- Transférer l'écouvillon dans un tube qui contient 5 à 10 ml de bouillon Brucella Agar. .
- Homogénéiser à l'aide d'un vortex pour avoir une opacité finale de 1 McFarland.

2- Ensemencement de l'antibiogramme

- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.
- Plonger l'écouvillon dans l'inoculum et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Faire des stries serrées à la surface entière de la boîte de gélose, en faisant tourner la boîte d'environ 60 °C entre les stries pour assurer une distribution uniforme et en répétant cette étape 3 fois. [20]
- Terminer l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Si plusieurs boîtes de Pétri sont ensemencées, recharger l'écouvillon à chaque fois.

3 - dépôt des disques d'antibiotiques et E-tests

- Déposer les disques d'antibiotique sur la gélose manuellement avec une pince stérile. (Maximum 4 disques sur boîte de pétri de 9 cm de diamètre)
- Appliquer une légère pression avec une pince stérile pour assurer un contact complet du disque avec la gélose.
- Pour les E-tests appliquer la bandelette sur la surface de la gélose avec l'échelle vers le haut et le code de la bandelette vers l'extérieur de la plaque, en la pressant avec une pince stérile sur la surface de la gélose et s'assurer que toute la longueur du gradient antibiotique est en contact complet avec la surface de la gélose.
- Eviter de déplacer les disques des antibiotiques et les bandelettes d'E-tests après application.
- Mettre les boîtes de pétri ensemencées et renversées à l'intérieur d'une jarre d'anaérobiose.
- Introduire des catalyseurs à l'intérieur de la jarre d'anaérobiose et la verrouiller hermétiquement.
- Connecter la jarre d'anaérobiose au générateur d'atmosphère anaérobie Anoxomat®

- Incuber la jarre pendant 48 heures à $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ en anaérobiose.

Remarque : l'incubation doit se faire rapidement dans les 15 minutes qui suivent le dépôt des disques (au-delà de 30 minutes les zones d'inhibition seront faussement agrandies).

4 - Lecture et interprétation de l'antibiogramme

- Après incubation mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse et les comparer aux diamètres des concentrations critiques.
- La CMI est lue directement sur l'échelle en $\mu\text{g/ml}$ au point où le bord de l'ellipse d'inhibition coupe la bandelette de test CMI. [20]

Annexe 14 : Les valeurs critiques de l'antibiogramme de *Bacteroides fragilis* [39]

5. 27. *Bacteroides* du groupe *fragilis* (*Bacteroides* et *Parabacteroides*)

Liste standard (EUCAST)		Liste complémentaire (CA-SFM)	
Amoxicilline-acide clavulanique Pipéracilline-tazobactam Imipénème Clindamycine Moxifloxacine Métrondazole		Ertapénème Tigécycline Linézolide Rifampicine Chloramphénicol	

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
<p>Les concentrations critiques et les diamètres ont été déterminés pour les espèces <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> et <i>Parabacteroides</i>. Certaines souches apparaissent faussement résistantes au métronidazole si l'anaérobiose n'est pas correcte. Il y a lieu de contrôler le résultat voire confirmer cette résistance par détermination de la CMI.</p> <p>La résistance au métronidazole a été observée chez quelques souches de <i>B. fragilis</i>, <i>B. thetaiotaomicron</i>, <i>B. ovatus</i>, <i>B. vulgatus</i>, <i>B. stercoris</i>, <i>B. uniformis</i>, <i>P. distasonis</i>, <i>P. merdae</i>, et <i>Odoribacter splanchnicus</i>.</p> <p>La résistance à l'imipénème a été observée chez <i>B. fragilis</i>, plus rarement chez <i>B. thetaiotaomicron</i> et <i>P. distasonis</i>.</p>								
Amoxicilline-acide clavulanique	4 ¹	8 ¹		20/10	21 ^A	17 ^A	17-20	<p>1/A. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en acide clavulanique est fixée à 2 mg/L.</p> <p>Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire. Les souches sensibles à l'amoxicilline-acide clavulanique sont également sensibles à pipéracilline-tazobactam. Il existe quelques souches résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique et sensibles à pipéracilline-tazobactam (défaut de porine).</p> <p>2/B. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en tazobactam est fixée à 4 mg/L.</p> <p>Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>Les souches résistantes à pipéracilline-tazobactam sont résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique.</p> <p>C. Pour les diamètres compris entre 18 mm et 23 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>La résistance aux carbapénèmes est croisée pour l'ensemble des carbapénèmes.</p> <p>3/D. Lecture après 48 ± 4h d'incubation. Pour les diamètres <15 mm, déterminer la CMI si nécessaire.</p> <p>4/E. Interprétation valable pour le tédizolide. Pour les diamètres < 28 mm, déterminer la CMI si nécessaire</p> <p>F. Pour les diamètres < 21 mm déterminer la CMI si nécessaire</p> <p>G. Pour les diamètres compris entre 14 et 18 mm, déterminer la CMI si nécessaire</p> <p>H. Un disque à 4ug est utilisable dans les mêmes conditions.</p> <p>Lecture après 48 ± 4h d'incubation. Pour les diamètres < 15 mm, contrôler le résultat voire déterminer la CMI. Un défaut d'anaérobiose peut entraîner une fausse résistance.</p>
Pipéracilline-tazobactam	8 ²	16 ²		30/6	21 ^B	17 ^B	17-20	
Ertapénème	0,5	0,5			-	-		
Imipénème	2	4		10	24 ^C	18 ^C	18-23	
Méropénème	2	8						
Clindamycine	4 ³	4 ³		2	-	15 ^D	8-15	
Linézolide ⁴	2	4		30	28 ^E	-		
Tigécycline	4	8		15	21 ^F	-		
Rifampicine	4	16		30	19 ^G	14 ^G		
Métrondazole	4	4		5 ^H	15	15	8-15	

Antibiotiques (suite)	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Chloramphénicol	8	8		30	23	23		
Moxifloxacine	4-2	2		5	24-18	18		Pour les diamètres compris entre 18 et 24 mm, déterminer la CMI si nécessaire.

Annexe 15 : Les valeurs critiques de l'antibiogramme des Bactéries à Gram négatif à l'exception de *Bacteroides* du groupe *fragilis* [39]

5. 28. Anaérobies stricts à Gram négatif à l'exception des *Bacteroides* du groupe *fragilis* et *Parabacteroides*

Prevotella, Porphyromonas, Fusobacterium, Mobiluncus, Bilophila	
Liste standard (EUCAST)	Liste complémentaire (CA-SFM)
Amoxicilline Amoxicilline- acide clavulanique Pipéracilline-tazobactam Impipénème Clindamycine Moxifloxacine Métronidazole	Ertapénème Tigécycline Linézolide Rifampicine Chloramphénicol

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
<p>Les concentrations critiques et les diamètres critiques ont été déterminés pour les espèces des genres <i>Bilophila</i>, <i>Fusobacterium</i>, <i>Mobiluncus</i>, <i>Porphyromonas</i> et <i>Prevotella</i>. Certaines souches peuvent être aéro-tolérantes et cultivées en atmosphère enrichie en CO₂. La sensibilité des bactéries anaérobies aéro-tolérantes doit être déterminée en anaérobiose.</p> <p>Certaines souches apparaissent faussement résistantes au métronidazole si l'anaérobiose n'est pas correcte. Il y a lieu de contrôler le résultat voire de confirmer cette résistance par détermination de la CMI.</p> <p>La résistance au métronidazole a été observée chez quelques espèces de <i>Prevotella</i> (ex. <i>P. baroniae</i> ; <i>P. buccae</i>, <i>P. bivia</i>, <i>P. dentalis</i>, <i>P. denticola</i>, <i>P. nanceiensis</i>, <i>P. melaninogenica</i>, <i>P. oralis</i>), exceptionnellement chez <i>Porphyromonas assacharolytica</i>.</p> <p>La résistance à l'impipénème a été observée chez <i>F. mortiferum</i> et <i>F. varium</i>.</p>								

Antibiotiques (suite)	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Pénicilline G	0,25	0,5		-	-			A. Chez <i>Fusobacterium</i> la nitrocéphaline permet de mettre en évidence la production d'une pénicillinase. Si présence de pénicillinase, répondre résistance croisée à la pipéracilline.
Amoxicilline	0,5	2 ^A			-	-		Chez <i>Prevotella</i> , la production de β-lactamase ne peut être recherchée à l'aide de la nitrocéphaline (mauvais substrat). Toute souche de CMI ≥ 0,5 mg/L produit une β-lactamase et doit être répondue résistante aux amino-pénicillines, à la pénicilline G, aux céphalosporines de première génération, au céfuroxime et aux céphalosporines de troisième génération orales. Une souche ayant une CMI < 0,25mg/L est considérée comme sensible et non productrice de β-lactamase.
Amoxicilline-acide clavulanique	4 ¹	8 ¹		20/10	21 ^A	17 ^A	17-20	Pour toutes les espèces, une différence entre les diamètres de l'amoxicilline et de l'amoxicilline-acide clavulanique ne signifie pas qu'il existe une production de β-lactamase (action antibactérienne intrinsèque de l'acide clavulanique).
Pipéracilline-tazobactam	8 ²	16 ²		30/6	21 ^B	17 ^B	17-20	1/A. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en acide clavulanique est fixée à 2 mg/L.
Ertapénème	0,5	0,5			-	-		Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Impipénème	2	4		10	24 ^C	18 ^C	18-23	2/ B. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en tazobactam est fixée à 4 mg/L. Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Méropénème	2	8						C. Pour les diamètres compris entre 18 et 23 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Clindamycine	4 ³	4 ³		2	-	15 ^D	8-15	3/D. Lecture après 48 ± 4h. d'incubation. Pour les diamètres <15 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Linézolide ⁴	2	4		30	28 ^E	-		4/E. Interprétation valable pour le tébizolide. Pour les diamètres < 28 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Tigécycline	4	8		15	21 ^F	-		F. Pour les diamètres < 21 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Rifampicine	4	16		30	19 ^G	14 ^G		G. Pour les diamètres compris entre 14 et 19 mm, déterminer la CMI si nécessaire.

Antibiotiques (suite)	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (μ g)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S \leq	R >	ZIT		S \geq	R <	ZIT	
Métronidazole	4	4		5 ^H	15	15	8-15	H. Un disque à 4 μ g est utilisable dans les mêmes conditions. Pour les diamètres < 15 mm, déterminer la CMI. En cas d'échec clinique, vérifier qu'il ne s'agit pas d'une hétéro-résistance au métronidazole qui peut apparaître après 3 à 5 jours d'incubation.
Chloramphénicol	8	8		30	23	23		
Moxifloxacine	4-2	2		5	24-18	18		Pour les diamètres compris entre 18 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.

Annexe 16 : Les valeurs critiques d'antibiogramme des bactéries anaérobies à Gram positif [39]

5. 29. Anaérobies stricts à Gram positif

Antibiotiques à tester

Anaérobies stricts à Gram +	
Liste standard (EUCAST)	Liste complémentaire (CA-SFM)
Amoxicilline Amoxicilline-acide clavulanique Pipéracilline-tazobactam Impénème Clindamycine Moxifloxacine Métronidazole Vancomycine	Ertapénème Tigécycline Linézolide Rifampicine Chloramphénicol

Antibiotiques	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Les concentrations critiques et diamètres critiques ont été déterminés pour les bacilles à Gram positif anaérobies les plus fréquemment isolés : <i>Actinomyces</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Cutibacterium</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> anaérobies stricts et les cocci à Gram positif. Les anaérobies stricts sont définis généralement comme ne cultivant pas en atmosphère enrichie en CO ₂ , mais de nombreux anaérobies à Gram positif non sporulés comme <i>Actinomyces</i> , de nombreuses souches de <i>Cutibacterium acnes</i> (ex <i>P. acnes</i>) et quelques souches de <i>Bifidobacterium</i> capables de croître en atmosphère enrichie en CO ₂ sont considérés comme anaérobies stricts. Plusieurs espèces de <i>Clostridium</i> dont <i>C. carnis</i> , <i>C. histolyticum</i> et <i>C. tertium</i> sont capables de croître en aérobiose mais ne sporulent pas en présence d'air. <i>Actinotignum schaalii</i> doit être considéré comme anaérobie strict. Pour toutes ces espèces, la sensibilité doit être déterminée en atmosphère anaérobie. Certaines souches apparaissent faussement résistantes au métronidazole si l'anaérobiose n'est pas correcte. Il y a lieu de contrôler le résultat voire confirmer cette résistance par détermination de la CMI. <i>Actinomyces</i> , <i>C. acnes</i> et <i>Propionibacterium</i> sont naturellement résistants au métronidazole.								

Antibiotiques (suite)	Concentrations critiques (mg/L)			Charge du disque (µg)	Diamètres critiques (mm)			Notes Chiffres arabes pour les commentaires portant sur les concentrations critiques (CMI) Lettres pour les commentaires portant sur les diamètres critiques d'inhibition
	S ≤	R >	ZIT		S ≥	R <	ZIT	
Amoxicilline ^A	4	8		20	21	17		A- La résistance à la pénicilline G, à l'amoxicilline et à la pipéracilline par production de β-lactamase a été décrite pour quelques souches de <i>Clostridium</i> (<i>C. butyricum</i> , <i>C. clostridioforme</i> , <i>C. ramosum</i> , <i>C. innocuum</i> , et de rares souches de <i>C. botulinum</i>). L'action des inhibiteurs de β-lactamase varie selon les espèces. La nitrocéphaline permet de mettre en évidence ces β-lactamases.
Amoxicilline-acide clavulanique	4 ¹	8 ¹		20/10	21 ^B	17 ^B	17-20	1/B. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en acide clavulanique est fixée à 2 mg/L.
Pipéracilline-tazobactam	8 ²	16 ²		30/6	21 ^C	17 ^C	17-20	Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Ertapénème	0,5	0,5			-	-		2/C. Pour évaluer la sensibilité, la concentration en tazobactam est fixée à 4 mg/L. Pour les diamètres compris entre 17 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Impénème	2	4		10	24 ^D	18 ^D	18-23	D. Pour les diamètres compris entre 18 mm et 23 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Méropénème	2	8						3/E. Lecture après 48h d'incubation. Pour les diamètres <15 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Clindamycine ³	4	4		2	-	15 ^E	8-15	4/F. Interprétation valable pour le tédzolide. Pour les diamètres < 28 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Linézolide ⁴	2	4		30	28 ^F	-		G. Pour les diamètres < 21 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Tigécycline	4	8		15	21 ^G	-		H. Pour les diamètres compris entre 14 et 19 mm, déterminer la CMI si nécessaire.
Rifampicine	4	16		30	19 ^H	14 ^H		J. Un disque à 4 µg est utilisable dans les mêmes conditions.
Métronidazole	4	4		5 ^J	15	15	8-15	Pour les diamètres < 15 mm, déterminer la CMI sauf pour les bacilles naturellement résistants.
Chloramphénicol	8	8		30	23	23		Quelques souches résistantes sont décrites parmi les cocci : <i>P. anaerobius</i> , <i>A. prevotii</i> , <i>F. magna</i> et <i>P. micra</i> .
Moxifloxacine	4-2	2		5	24-18	18		Pour les diamètres compris entre 18 et 20 mm, déterminer la CMI si nécessaire
Vancomycine		2		30		17		La résistance a été décrite chez quelques espèces parmi les <i>Clostridium</i> , <i>C. innocuum</i> , <i>C. lavalense</i> , <i>C. ramosum</i> et chez <i>Ruminococcus gausvreauii</i> . La résistance croisée à la Téicoplanine n'est pas systématique (cf. résistance naturelle).

Résumé

Les abcès et les suppurations profondes causées par les bactéries anaérobies sont des infections graves qui se développent dans les tissus profonds du corps en l'absence d'oxygène. Les bactéries anaérobies sont des micro-organismes capables de survivre et de se multiplier dans des environnements privés d'oxygène. Elles sont souvent responsables de ces infections profondes en raison de leur capacité à coloniser des zones où la circulation sanguine est restreinte et où l'oxygène est limité. Cette étude a pour objectif la caractérisation du profil bactérien des infections profondes au sein du laboratoire des Bactéries Anaérobies et du Botulisme IPA (Institut Pasteur d'Algérie). De plus, elle a permis d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries responsables de ces infections. Un nombre de 207 prélèvements ont été analysés ce qui a permis de diagnostiquer 38.65 % des infections à bactéries anaérobies strictes. Les principaux prélèvements sont poche parodontale (69.56%) suivie de liquide pleural (14.00%) ensuite abcès cérébral (10.14%). Les principales bactéries isolées appartiennent aux genres des *Porphyromonas* spp (43.15 %), suivie par les *Actinomyces* spp (28.08 %), puis *Prevotella* spp (8.22 %), *Bacteroides* spp (6.16 %), *Propionibacterium* spp (6.16 %), *Peptostreptococcus* spp (5.48 %), et enfin *Gemella* spp (2.74 %).

Mots-clés : Abscès, infections profondes, bactéries anaérobies.

Abstract

Abscesses and deep suppurations caused by anaerobic bacteria are serious infections that develop in the deep tissues of the body in the absence of oxygen. Anaerobic bacteria are microorganisms capable of surviving and multiplying in oxygen-deprived environments. They often play a role in these deep infections due to their ability to colonize areas with restricted blood circulation and limited oxygen. This study aims to characterize the bacterial profile of deep infections within the Anaerobic Bacteria and Botulism Laboratory at the Pasteur Institute of Algeria (IPA). Additionally, it evaluates the antibiotic sensitivity of the bacteria responsible for these infections. A total of 207 samples were analyzed, leading to the diagnosis of 38.65% of infections caused by strict anaerobic bacteria. The primary sample sources were periodontal pockets (69.56%), followed by pleural fluid (14.00%), and cerebral abscesses (10.14%). The predominant isolated bacteria belong to *Porphyromonas* spp (43.15%), followed by *Actinomyces* spp (28.08%), *Prevotella* spp (8.22%), *Bacteroides* spp (6.16%), *Propionibacterium* spp (6.16%), *Peptostreptococcus* spp (5.48%), and finally *Gemella* spp (2.74%).

Key-words: Abscesses, deep infections, anaerobic bacteria.