



PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence en Sciences & Techniques :

Biologie & Santé

***Apport de l'examen cyto bactériologique de
liquide céphalo-rachidien au diagnostic de la
méningites bactériennes***

Réalisé par: EL MAHTAL Karima

Encadré par:

Pr. ANANOU Samir

Pr .MAHMOUDMoustapha

Devant le jury composé de :

- **Pr.ANANOU
Samir.....Président**
- **Pr. MAMOUD**

Dédicace

Le fruit de ce travail mérite d'être dédié :

A mes parents :

Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices que vous pouvez consentir pour notre éducation et bien être, afin de nous puissions poursuivre nos études et réaliser nos objectifs, que Dieu vous alloue une longue vie.

A mes amies :

Je vous exprime à travers ce modeste travail mes sentiments d'amour et d'affection.

A mes enseignants et mes collègues

Remerciement

Au terme de mon stage que j'ai effectué au sein de **l'hôpital CHU Hassan II Fès**, j'aimerais remercier vivement l'hôpital qui m'a accueillie.

Mes vifs remerciements s'adressent également à mes encadrant **MrS. ANANOUE** et **Mr M.MAHMOUD**, pour leur aide précieuse, et pour les informations et les notices techniques qu'ils m'ont fournies, ainsi que pour leur disposition et leur générosité.

À l'ensemble du personnel et des techniciens de l'hôpital CHU Hassan II Fès, pour leur chaleureux accueil et leur soutien tout au long de la période de mon stage, qu'ils trouvent, eux aussi, l'expression de mes profondes reconnaissances.

J'adresse pareillement mes remerciements à tous les enseignants de FST qui ont contribué à ma formation pendant cette année et particulièrement aux enseignants de la licence Biologie et Santé.

Enfin, je remercie vivement le jury qui ont voulu accepter d'assister à l'exposition du projet et de juger ce travail, qu'ils veuillent trouver ici l'expression de mes profondes gratitude.

Glossaire

LCR : liquide céphalo-rachidien

OMS : l'organisation mondiale de la santé

P : pénicillines

AMP : Ampicilline

AML : Amoxicilline

AMC : Ac clavulanique

OX : Oxacilline

IPM : imipenème

CF/KF : Céfalotine

CTX : Céfotaxine

CRO : Céftriaxone

CAZ : Céftrizidime

AN/AK : Amikacine

GN : Gentamicine

VA : Vacomycine

TEC : Teicoplanine

TE : Tétracycline

SP : Spiramycine

AN : Acide Nalidixique

CIP : ciprofloxacine

NOR : Norfloxacine

SXT : sulfaméthoxazole+triméthoprim

Liste des figures

Figure 1: Anatomie des méninges Figure 2 : Principales étapes de la physiopathologie des méningites bactériennes

Figure 3 : Cadre de référence dans le cas un examen cyto bactériologique du LCR Figure 4 : Différents aspects macroscopiques du LCR Figure 5 : Examen bactériologique direct du LCR après coloration de Gram Figure 6 : Photos des milieux des cultures ensemencées Figure 7: lecture des résultats d'une galerie d'identification Figure 8 : *N. meningitidis*, ensemencement en Stries et aspect des colonies sur gélose au sang. Figure 9: photo de l'automate PhoenixTM Figure 10 : Cartouches Contient un antibiotique à une concentration donnée

Figure 11 : distributeur de disques Figure 12 : pourcentage des LCR selon les résultats de culture

Figure 13: Pourcentage des méningites suspectées selon le sexe

Figure 14: Répartition des méningites selon les services hospitaliers.

Figure 15 : pourcentage de LCR selon l'aspect Figure 16 : Pourcentage du LCR selon le type de bactérie isolée Figure 17 : pourcentage de sensibilité du *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques Figure 18: pourcentage de sensibilité du *Neisseria meningitidis* aux antibiotiques testés Figure 19 : pourcentage de sensibilité de l'*Acinetobacter Baumannii* aux antibiotiques Figure 20 : pourcentage de sensibilité du *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques testés

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales bactéries responsables des méningites bactériennes.

Tableau 2 : comparaison biochimique entre LCR normal et un LCR en cas de méningite. Tableau 3: Les antibiotiques sensibles testés pour les germes isolés

Sommaire

Introduction	1
Présentation du lieu de stage	2
Chapitre I : Partie revue bibliographique	3
Introduction	4
I. Méningites bactériennes.....	4
1. Agents pathogène	5
1.1. <i>Neisseriameningitidis</i>	5
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
1.3. <i>Haemophilus influenzae</i>	7
2. Autres agents pathogènes	8
3. physiopathologie.....	8
4. manifestation cliniques	9
5. traitement de la méningites bactériennes.....	10
5.1. traitement	10
5.2. prévention	10
II. méningites virales	11
III. méningites fongiques	12
Chapitre III : Phase méthodologique	13
Introduction	14
I. devis de recherche	14
II. cadre de référence	16
III. protocole de l'examen cyto bactériologique du LCR	17
1. prélèvement du LCR	17
2. Etude bactériologique	17
2.1 Examen macroscopique	17
2.2 Examen microscopique.....	18



2.3 La mise en culture.....	19
2.4 L'identification des germes	20
2.5 Etude la sensibilité aux antibiotiques	21
3. Analyse complémentaire	23
Chapitre III. Résultats et discussion	24
I. Répartition des méningites	25
1. Répartition des cas selon le sexe	25
2. Répartition des cas selon les services hospitaliers	26
II. Résultats de l'examen cyto bactériologique du LCR	27
1. Examen macroscopique du LCR	27
2. Examen bactériologique du LCR.....	28
2.1 l'identification des germes	28
III. Résultats de l'étude de sensibilité aux antibiotiques.....	29
Conclusion	33



INTRODUCTION

La méningite est une maladie redoutable, elle apparaît soudainement, frappe tous les âges, particulièrement les nourrissons, les enfants et les jeunes et peut tuer en quelques heures. Au Maroc, la méningite, notamment due à méningocoque (*Neisseriameningitidis*), constitue un sérieux problème de santé publique, c'est la seule forme de méningite bactérienne qui provoque des épidémies et qui constitue un motif courant de consultation en médecine générale. En effet, la méningite méningococcique est considérée comme un problème mondial (500 000 cas par an selon l'OMS). Dans 20 à 25 % des cas, les méningites sont d'origine bactérienne souvent mortelle, 90% des cas sont causées par *Neisseriameningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. 70 à 80 % des cas sont d'origine virale.

Un programme national de lutte contre cette maladie a été mis en place depuis 1989 dont la stratégie a été axée principalement sur la surveillance de la méningite méningococcique. Ce programme a été réorienté vers une surveillance exhaustive de toutes les formes de méningites avec plus d'intérêt pour les trois espèces bactériennes.

L'examen cytologique et bactériologique du liquide céphalo-rachidien (LCR) constitue un examen clé dans la démarche diagnostique et de la surveillance de l'efficacité thérapeutique des méningites.

L'objectif général de cette étude est de mettre en valeur l'importance de l'examen bactériologique du liquide céphalo-rachidien au diagnostic des méningites. Dont ces objectifs spécifiques :

- a) Connaître les principales étiologies des méningites ;
- b) Savoir la démarche à suivre pour un examen du LCR ;
- c) Etudier l'aspect macroscopique et microscopique du LCR normal et pathologique ;
- d) Identifier les germes impliqués dans les méningites et évaluer leur antibiothérapie.

Présentation du lieu de stage :

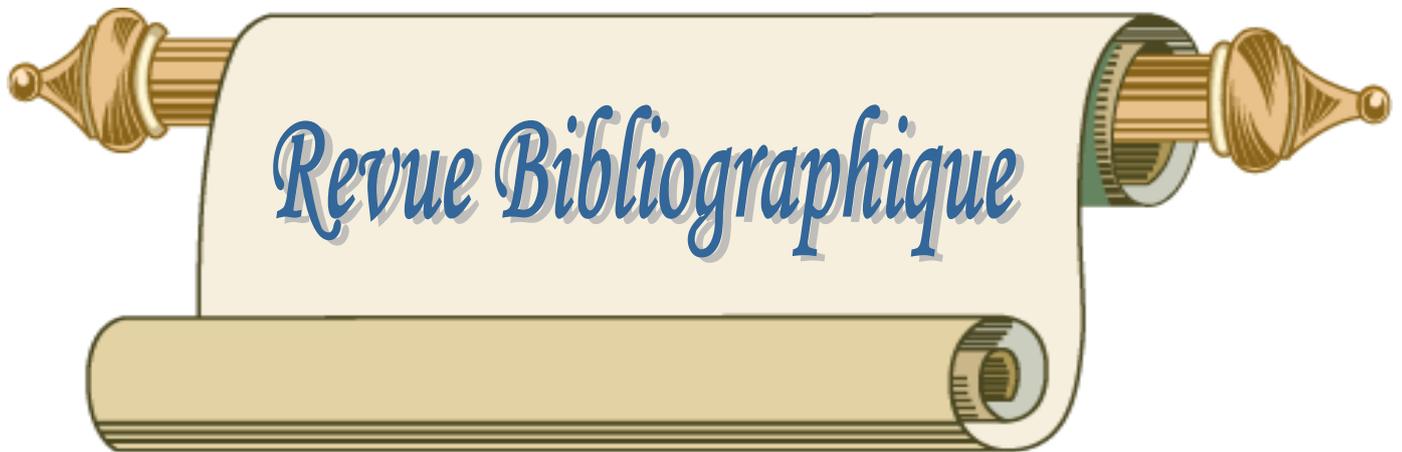
Mon stage a été effectué au service de bactériologie au sein du laboratoire central d'analyse médicale du centre hospitalier universitaire Hassan II de Fès, ce dernier comporte plusieurs départements et assure diverses activités.

C'est conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique ;
- Bactériologie-immunoanalyses ;
- Biochimie et pharmaco-toxicologie ;
- Hématologie ;
- Génétique médicale et biologie moléculaire .

Il se compose :

- Salle de réception
- Salle de prélèvements
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie
- Laboratoire d'hématologie
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie
- Laboratoire de parasitologie
- Laboratoire de génétique
- Laboratoire d'anatomie pathologique
- La création d'un laboratoire central d'analyses médicales au sein du CHU



I. Introduction

La méningite est une infection du système nerveux central limitée aux membranes qui enveloppent le cerveau et la moelle épinière (méninges). Les méningites infectieuses se répartissent en trois groupes :

- **Les méningites bactériennes** : sont dues le plus souvent au *Neisseriameningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*. D'autres bactéries peuvent être à l'origine de méningite comme *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. Le bacille tuberculeux . Les méningites d'origine bactérienne sont graves car elles évoluent rapidement et sont associées à un important risque de mortalité.
- **Les méningites virales** : sont principalement dues à des entérovirus (dans 80% des cas). Divers autres virus sont impliqués comme le virus *Herpes simplex* et le virus de la poliomyélite. généralement bénignes et d'évolution favorable, pouvant survenir par petites épidémies au printemps et en été.
- **les méningites fongiques** : sont dues à des champignons (principalement *Cryptococcus neoformans* et *Candida*), souvent rares et survenant sur les sujets immunodéprimés.

II. Méningites bactériennes

Les infections bactériennes du système nerveux central peuvent toucher uniquement les méninges, en provoquant une méningite, ou bien attaquer le parenchyme cérébral, en donnant naissance à un abcès ou encéphalites.

Les méningites bactériennes sont des infections des méninges (Figure 1) et du liquide céphalo-rachidien (LCR) qui entourent le cerveau et la moelle épinière. Les méningites bactériennes ont toujours constitué un important problème de santé publique, non seulement parce qu'elles surviennent par épidémie, mais également en raison de la forte mortalité (de 10 à 30 %, selon l'étiologie).

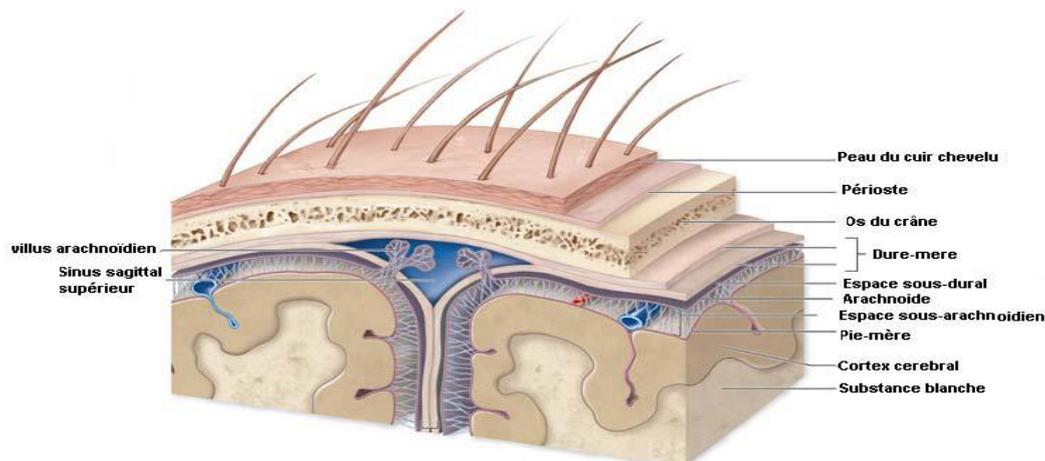


Figure 1: Anatomie des méninges

1. Agents pathogènes

1.1 *Neisseriameningitidis*

Le méningocoque ou *Neisseriameningitidis* est une bactérie de la classe des cocci Gram négatifs faisant partie des principaux germes responsables de méningite. *Neisseriameningitidis* a été découvert en 1887 par Wiechselbaum dans le LCR de sujets atteints de méningite aiguë. C'est un germe strictement humain commensal des muqueuses du rhinopharynx. Il appartient à la famille des Neisseriaceae et au genre Neisseria.

1.1.1 *Caractères bactériologiques*

Neisseriameningitidis a la forme d'une coque asymétrique en grain de café. Les méningocoques se présentent groupés par deux, en diplocoques adjacents par leur face aplatie. Ils sont Gram négatif, mesurant 0,8 à 1 micron de diamètre.

Neisseriameningitidis est un germe aérobic strict, exigeant pour sa culture, des milieux enrichis et une atmosphère enrichie à 10 % de CO₂.

La culture se fait sur la gélose au sang cuit ou Mueller-Hinton. La température optimale de croissance est de 36 °C et le pH est égal à 7. Les colonies sur gélose enrichie sont petites, rondes, bombées, lisses et translucides après 24 heures d'incubation.

1.1.2 *Caractères biochimiques :*

Neisseriameningitidis possède une oxydase, une catalase et une gamma-glutamyl transférase (δ GT). Il attaque le glucose et le maltose par voie oxydative. Il réduit parfois les nitrites, mais

pas les nitrates. Il n'a pas d'activité désoxyribonucléique, pas d'action sur la tributyrine, pas de protéolyse.

1.1.3 Caractères antigénique et physiopathologie :

La paroi de *Neisseriameningitidis* est l'élément intéressant de la structure du méningocoque. Elle porte des pilis qui interviennent dans l'adhésion aux cellules des muqueuses et présente trois constituants majeurs d'intérêts diagnostic, épidémiologique et prophylactique : les polysides capsulaires, les protéines de la membrane externe, et les lipopolysaccharides. La porte d'entrée de ce germe est le rhinopharynx, il s'agit d'une bactérie à multiplication intracellulaire. La colonisation résulte des capacités d'adhérence de ce pathogène au niveau de l'épithélium rhino-pharyngé. Un envahissement sanguin peut entraîner le purpura fulminant. Les symptômes cliniques dépendent des médiateurs sécrétés par les cellules hématopoïétiques en réponse de l'attaque bactérien (comme certaines cytokines notamment le facteur de tumeur nécrotique TNF α).

1.2 Streptococcus pneumoniae

Découvert en 1881 par Pasteur, il ne survit pas dans le milieu extérieur. Il fait partie de la flore bactérienne normale qui colonise le tractus respiratoire supérieur de l'homme. La colonisation du rhino-pharynx commence 24h après la naissance.

1.2.1 Caractères bactériologiques

Streptococcus pneumoniae est une Gram positive, de forme cocci formant des diplocoques. Il s'agit d'un germe aéro-anaérobie facultatif, neutrophile (pH optimal de croissance 7,2) et mésophile (température optimale de croissance 36°C).

Elle a une mauvaise croissance sur les milieux courants et une bonne croissance sur les milieux enrichis à 5% de sang frais, d'ascite ou de sérum en donnant de petites colonies transparentes en goutte de rosée à bords nets et entourés d'une zone d'hémolyse de type alpha.

1.2.2 Caractères biochimiques

Streptococcus pneumoniae ne possède pas de catalase, ni d'oxydase ; il entraîne une fermentation lactique de nombreux sucres. Il est lysé par la bile et les sels biliaires (mécanisme mal connu). Il est sensible à l'optochine (éthyl-hydro-cupréine).

1.2.3 Antigènes et facteurs de virulence

La cellule de *Streptococcus pneumoniae* est entourée d'une capsule de nature polysaccharidique. La paroi est constituée d'un mucopeptide (responsable de la rigidité de la paroi), d'un polyside C, et d'un antigène pariétal R (commun à tous les streptocoques).

1.3 *Haemophilus influenzae*

Découvert en 1890 par Pfeiffer, l'hémophilus est un parasite strict des muqueuses de l'homme et de très nombreux vertébrés à sang chaud ou froid. Il est plus fréquemment rencontré au niveau du pharynx. Il ne se rencontre jamais dans la nature.

1.3.1 *Caractères bactériologiques*

C'est un bacille Gram négatif, immobile, souvent sous forme de coccobacille (avec 0,5 à 2 µm) de large. Il existe sous forme capsulée ou non capsulée.

Il ne peut pousser que sur des milieux nutritifs complétés avec du sang de mammifères qui apporte des facteurs nécessaires à sa croissance. Sur gélose au sang cuit ou complétée en facteurs de croissance purifiés, il donne des colonies convexes, grisâtres et translucides (0,5 à 1 mm de diamètre) après 24 heures à 37°C. La culture n'exige pas de CO₂, mais celui-ci facilite la croissance.

1.3.2 *Caractères biochimiques*

H. influenzae est un aéro-anaérobie facultatif, exigeant à l'hémine (X) et le NAD (V) pour sa croissance. Il possède une catalase et il fermente le glucose, le désoxyribose et le xylose avec une acidification sans production de gaz. Il ne métabolise pas le saccharose, le lactose et le mannitol. L'uréase, l'ornithine décarboxylase (ODC) et la production d'indol varient en fonction des biotypes. Il produit une phosphatase alcaline de façon constante.

1.3.3 *Antigènes et facteurs de virulence*

Hi présente une capsule polysaccharidique, Les antigènes sont mis en évidence par agglutination en présence d'un immunosérum spécifique. Comme antigène somatique, deux protéines pariétales sont connues :

- la protéine M qui serait toxique et variable antigéniquement selon les souches.
- Un antigène protéique de type fimbriae capable d'agglutiner les hématies humaines du groupe O.

2. Autres agents pathogènes

D'autres bactéries pathogènes peuvent être à l'origine de méningite comme *Mycobacterium tuberculosis* (bacille de Koch, BK), *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus agalactiae* et *Bacillus anthracis*.

Tableau 1 : Principales bactéries responsables des méningites bactériennes.

Adulte et enfant ≥ 5 ans	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria monocytogenes</i> (immunodépression, grossesse, alcoolisme)
Nourrisson et enfant < 5 ans	<i>Neisseria meningitidis</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i>
Nouveau-né et nourrisson < 90 jours	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> K1 <i>Listeria monocytogenes</i> (< 3 semaines)

3. Physiopathologie :

La pénétration des bactéries, généralement par voie hématogène, à le LCR est indispensable pour le déclenchement de la méningite, cette colonisation est accompagnée d'un franchissement secondaire de la barrière hémato-méningée. Une fois dans le LCR, la bactérie se développe et la concentration en immunoglobulines diminue par rapport au sang. Ce déficit en anticorps et en complément est attribué au faible pouvoir bactéricide du LCR.

La pénétration des bactéries dans le LCR provoque la production des cytokines qui conditionnent l'ensemble de la cascade physiologique. Des observations montrent que la production de ces cytokines dans le LCR est nécessaire au déclenchement de la méningite.

L'afflux des polynucléaires dans le LCR est la première conséquence de la libération de cytokines.

La pauvreté de LCR en nutriments entraîne l'arrêt de la croissance bactérienne. Ceci explique la lyse bactérienne qui libère des composants responsables au déclenchement de l'exsudat inflammatoire. D'autre part, une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est observée.

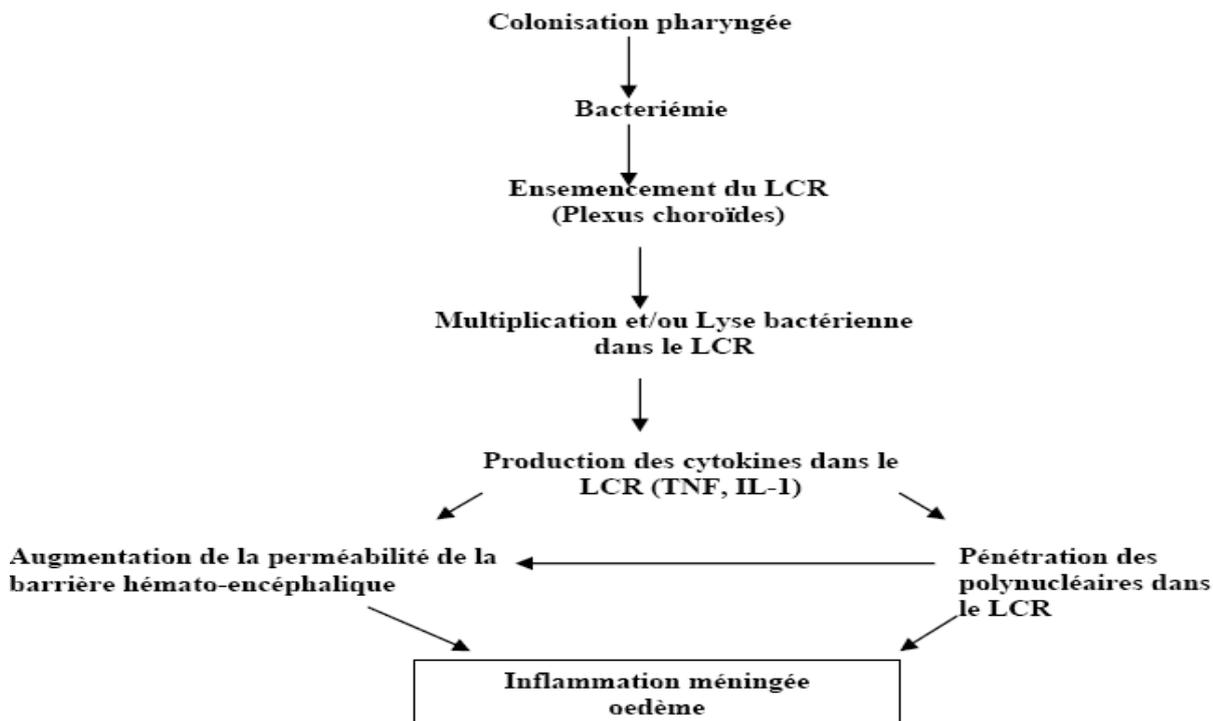


Figure 2 :Principales étapes de la physiopathologie des méningites bactériennes

4. Manifestation cliniques

♣ Chez l'enfant au-delà de 2 ans :

Le tableau clinique reste conventionnel : la fièvre représente l'essentiel du versant infectieux. Elle est en général élevée (> 38°C) et précède les autres symptômes de quelques heures ou de quelques jours.. Nausées, vomissements et céphalées sont d'emblée évocatrices. Le syndrome méningé se résume à la constatation de la raideur de la nuque, signes de Kernig (impossibilité d'obtenir l'extension de la jambe sur la cuisse chez le malade assis ou couché) et le signe de Brudzinsky (flexion passive du genou lors de la flexion forcée de la nuque ; du tripode) la bradycardie et davantage aux troubles comportementaux qu'à la classique photophobie.

♣ Chez l'enfant avant 2 ans :

Le tableau clinique peut être identique au précédent. Mais en climat fébrile, la raideur peut être absente et remplacée par de l'hypotonie (méningite à nuque molle) ; les vomissements remplacés par un refus alimentaire, très suspect chez le nourrisson. Les crises convulsives sont d'emblée évocatrices, au même titre que la somnolence ou l'irritabilité. La tension anormale, voire le bombement de la grande fontanelle, des troubles vasomoteurs surtout des extrémités, peuvent compléter le tableau fébrile et être immédiatement suspects.

♣ **Chez le nouveau-né (0 à 3 mois) :**

Des présentations particulières peuvent être les alternatives aux précédentes. La fièvre peut être modérée ou même manquer, remplacée alors par normo ou hypothermie. Des convulsions sans cause apparente surviennent dans 40 à 50 % des cas. Tout peut se résumer à des troubles comportementaux (irritabilité, somnolence), ou à des manifestations neurovégétatives : détresse respiratoire, troubles vasomoteurs (syndrome Arlequin), accès tachy ou bradycardiques. Hypotonie, refus du biberon en climat d'altération de la thermorégulation doivent donner l'alerte. Le bombement de la fontanelle, si évocateur quand il existe, n'est présent que dans 1/3 des cas.

5. traitement de la méningite bactérienne :

5.1 Traitement

Le traitement antibiotique doit être bactéricide car, à la différence du sérum, le LCR ne possède pas de capacité de bactéricide naturelle et ne peut donc s'opposer à la pénétration et à la multiplication des bactéries. En effet, l'activité des macrophages, des anticorps et du complément y est fortement réduite.

Les antibiotiques utilisés dans le traitement de la méningite sont choisis pour leur bonne diffusion dans le LCR sont les suivants :

- **Les pénicillines** (Amoxicilline, Ampicilline, Pénicilline G, Pénicilline V, Piperacilline) : ils sont utilisés dans le traitement des méningites. Ils inhibent la synthèse de la paroi bactérienne ;
- **Les céphalosporines** (Cefixime, Cefotaxime, Ceftriaxone) : Ils inhibent également la synthèse de la paroi bactériennes, mais diffèrent des pénicillines par leurs effets secondaires ;
- **Les aminosides** (Streptomycine, Tebramycine, Amikacine, Gentamicine) : ils inhibent la synthèse protéique.
- **Les macrolides** (Azitromycine, Érythromycine) : ils inhibent la synthèse protéique.

- **Les tétracyclines** (Doxycycline, Tétracycline) : Ils inhibent la synthèse protéique ;
- **Les quinolones** (Ciprofloxacin, Levofloxacin, Norfloxacin)
- **Les sulfamides** (Sulfazalazine, Sulfaméthoxazole) : Ils inhibent la synthèse de l'acide tétrahydrofolique.

5.2 Prévention :

D'une part, le traitement antibiotique est essentiel, il doit être combiné à un traitement symptomatique. Il a pour but de stériliser, le plus rapidement possible, le foyer infectieux afin de réduire le risque de mortalité et des séquelles neurologiques et sensorielles.

D'autre part, la vaccination. En effet, quatre antigènes polysaccharidiques spécifiques sont actuellement disponibles, relevant des sérogroupes A, C, Y, W135. Ils sont distribués sous forme lyophilisée, et sont injectés par voie intramusculaire ou sous-cutanée.

En plus, il existe des vaccins qui sont des polysaccharides capsulaires induisant une réponse immunitaire thymo-indépendante variable avec l'âge : vaccin bivalent A-C, vaccin trivalent A-C-W135 et vaccin quadrivalent A-C-Y-W135.

III. Méningites virales

La méningite virale peut être causée par de nombreux virus différents les uns des autres. Le groupe le plus répandu est celui des entérovirus. On dénombre environ 80 types différents d'entérovirus. Habituellement, ils n'exercent aucun effet remarquable ou n'entraînent que de légers symptômes de rhume ou de grippe, tels que mal de gorge, congestion nasale et raideur. Ils sont rarement à l'origine d'une méningite. Mais même ainsi, ils restent responsables de la moitié des cas de méningite virale. Les entérovirus sont contagieux. Ils se transmettent habituellement d'un sujet à un autre par contact direct avec de la salive, des expectorations, du mucus nasal ou des excréments). Les tout-petits et les jeunes enfants qui mettent des jouets en bouche et partagent leurs aliments et leurs couverts sont susceptibles de s'infecter mutuellement. Les contacts intimes, tels que le baiser, répandent ce virus. On peut aussi le contracter en touchant un objet qu'une personne infectée a déjà manipulé, puis en se frottant le nez, la bouche ou les yeux. Les adultes qui changent les couches d'un enfant infecté peuvent également contracter cette maladie.

IV. Méningites fongiques

La méningite fongique est une maladie rare mais, lorsqu'elle se déclare, elle peut mettre la vie en danger. Trois champignons microscopiques différents sont les principaux micro-organismes qui en sont responsables. Il s'agit de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Histoplasma*.

Candida albicans est présent à des endroits tels que la bouche, le tube digestif et le vagin des personnes en bonne santé, habituellement sans poser le moindre problème. Il peut cependant causer une infection fongique appelée muguet et, dans de rares cas, une forme dangereuse de méningite. Cette maladie a tendance à survenir chez les bébés prématurés dont le poids est très bas à la naissance ou chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli par le SIDA, une chimiothérapie anticancéreuse, une transplantation d'organe ou une greffe de moelle osseuse, le diabète ou une autre affection.

Cryptococcus neoformans est un champignon microscopique très répandu dans la terre. Il s'agit de la cause la plus fréquente de méningite, qui ne touche normalement que les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Cette forme de méningite est potentiellement mortelle.

Histoplasma est également un champignon microscopique, présent dans la terre et capable de causer la méningite et d'autres maladies chez les personnes dont le système immunitaire est affaibli. Les [symptômes](#) sont généralement identiques à ceux qui sont imputables aux autres causes. Dans tous les cas, l'infection se traite à l'aide de médicaments antifongiques.



Matériel et méthode

L'examen du LCR doit se faire sans délai à la suite d'une suspicion de méningite. La précocité de ce diagnostic et l'examen cytochimie du LCR permettent de reconnaître les germes à la cause de la maladie et de faciliter un traitement antibiotique approprié et immédiat. De manière spécifique, l'examen cyto-bactériologique du LCR passe par les étapes suivantes :

- ensemencement systématique d'urgence des milieux de culture permettant la croissance des bactéries les plus souvent responsables de la méningite;
- classement du LCR en fonction de l'aspect pour faciliter la reconnaissance des catégories suivantes : LCR normal, purulent, trouble, hémorragique, eau de riz ;
- précision de la nature de méningites (bactérienne/virale) ;
- étudier le germe responsable de méningites si la culture est positive ;
- interprétation des résultats de culture ;

I. Devis de recherche

1. Type d'étude :

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée du 1er Décembre 2012 au 1er Mai 2014, concernant les patients hospitalisés et les patients externe venant au centre hospitalier universitaire Hassan II Fès en suspicion de méningite et ayant bénéficié d'un examen du liquide céphalo-rachidien.

2. Milieu d'étude :

Le milieu retenu pour cette étude est le laboratoire de bactériologie de l'hôpital CHU Hassan II Fès.

3. Population cible :

Les patients hospitalisés aux différents services (chirurgie pédiatrie, réanimation, urgence....) et les patients externes pris en charge en consultation de méningites à l'hôpital de jour

4. Taille d'échantillon :

Il se limite à 2314 échantillons de liquides céphalo-rachidiens reçus au laboratoire de bactériologie CHU pendant la période d'étude.

5. Méthodologie de collecte de donnée :

Il s'agit d'une combinaison de deux approches :

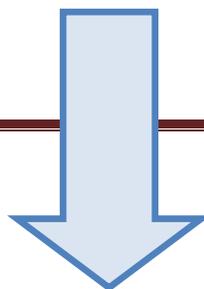
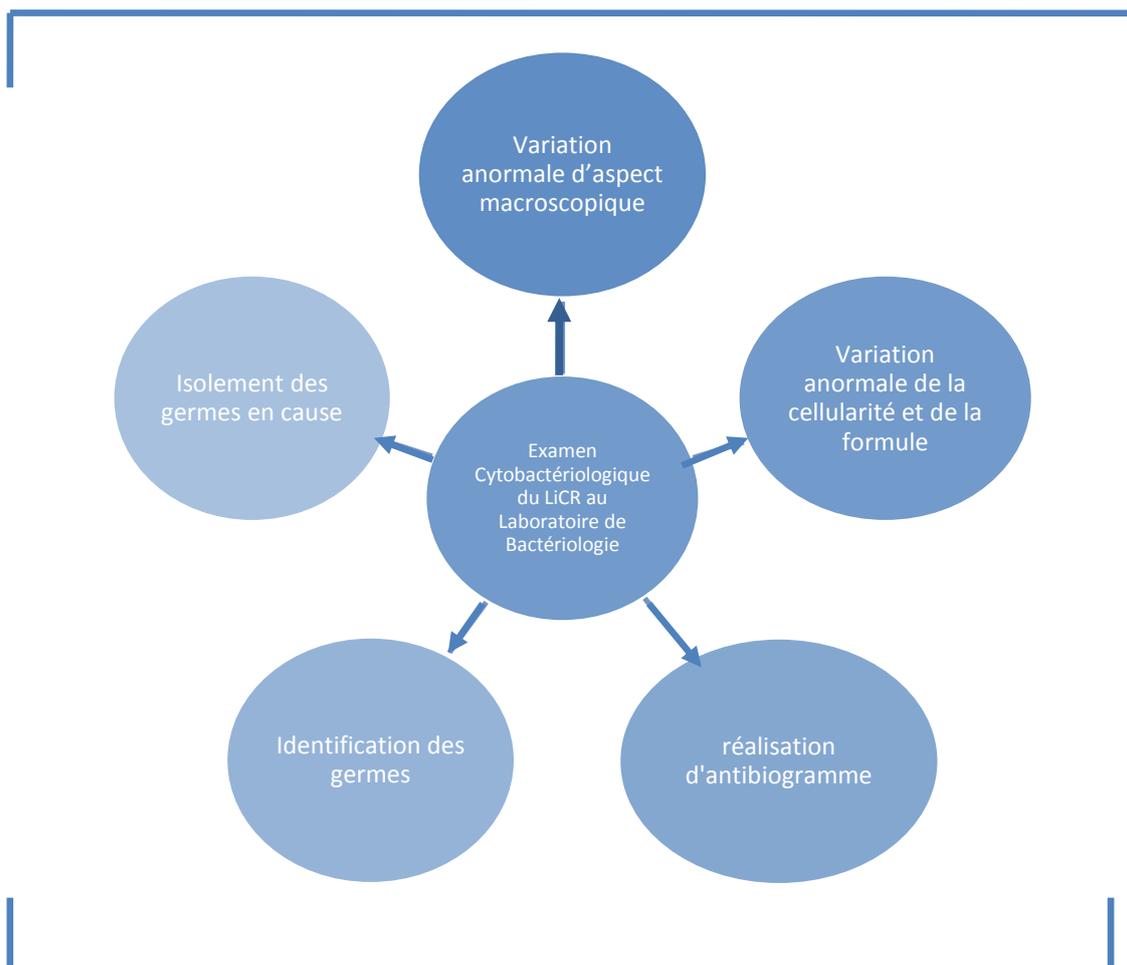
❖ *Méthode d'observation indirecte :*

Elle est basée essentiellement sur la consultation et l'exploitation de différents documents (livres, articles scientifiques...etc.) et qui sont mentionnés dans les références bibliographiques.

❖ *Méthode d'observation directe :* fondée sur deux points :

1. L'observation, l'assistance puis la réalisation pratique effective des examens cyto bactériologiques du liquide céphalo-rachidien au laboratoire de l'hôpital CHU Hassan II FES.
2. l'exploitation des données des registres de laboratoire de l'examen cyto bactériologique du LCR des années 2012-2013-2014.

II. Cadre de référence:



Etiologies des méningites bactériennes

Figure 3 : Cadre de référence dans le cas un examen cyto bactériologique du LCR

III. Protocole de l'examen cyto bactériologique du LCR

1. Prélèvement du liquide céphalo-rachidien (LCR)

Les prélèvements du liquide céphalorachidien par ponction lombaire ont été réalisés par un personnel expérimenté (acte médical). La quantité moyenne du LCR suffisante pour réaliser des examens est de 3 ml, recueillie dans 3 tubes stériles différents numérotés 1, 2, 3 servant respectivement à l'examen biochimique, microbiologique et cytologique. L'acheminement du LCR vers le laboratoire doit se faire sans délai (moins de 30 minutes) en raison de la lyse rapide des polynucléaires (jusqu'à 50 % en 2 heures), et à l'abri du froid en raison de la fragilité de certaines bactéries, notamment les méningocoques. Un minimum de renseignements cliniques, (en particulier l'âge, les traitements antibiotiques antérieurement reçus par le malade..) doit être transmis au laboratoire.

2. Etude bactériologique :

L'aboutissement de l'examen du LCR passe par la réalisation des opérations telles que le prélèvement, la réalisation des cultures, l'examen cytologique et enfin l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.

2.1 Examen macroscopique

On tiendra compte pour l'interprétation des résultats l'aspect du liquide, sa composition cytologique et de l'analyse chimique (protéïnorachie, glycorachie, chlorurachie). Il permet de Classer le LCR en catégories suivantes : LCR normal, purulent, hémorragique. ou encore trouble.

♣ **LCR normal**

L'aspect macroscopique : « eau de roche »

♣ **LCR «purulent»**

Il peut être blanc-grisâtre ,ce qui révèle la présence de pus.

♣ **LCR hémorragique**

La contamination du LCR par des globules rouges fait discuter un traumatisme lors de la ponction lombaire ou une hémorragie sous arachnoïdienne.

Une diminution progressive des globules rouges constatée sur un compte séquentiel des cellules dans 3 tubes de LCR est en faveur d'un traumatisme vasculaire lors du prélèvement.

♣ **LCR trouble**

L'aspect xanthochromique ou encore trouble du LCR est directement lié à l'hyperleucocytose présent dans le LCR, ce trouble apparaissant dès la présence de 200 globules blancs par millimètre cube.

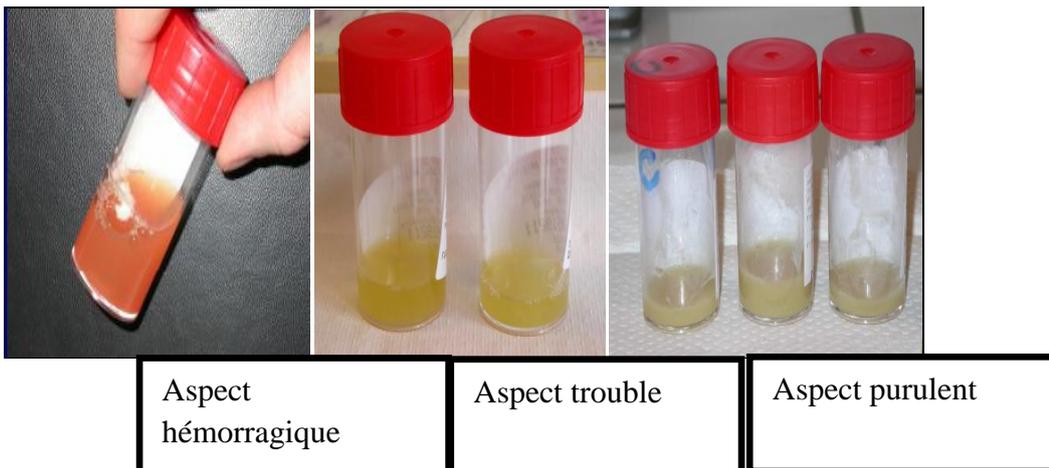


Figure 4 : Différents aspects macroscopiques du LCR

2.2 Examen microscopique:

Le liquide céphalo-rachidien est examiné entre lame et lamelle pour apprécier la richesse cellulaire. La numération des éléments est réalisée sur cellule de Malassez, Il s'agit de la numération des éléments figurés (leucocytes et hématies) présents dans le LCR et le résultat est exprimé en éléments par mm^3 . A l'état normal, le LCR a moins de 5 éléments / mm^3 (Le LCR du nouveau-né peut contenir de 10 à 30 éléments / mm^3 dont 50% de polynucléaires)..si la cytologie est positive (supérieur à la valeur normale) ,Une formule leucocytaire doit être effectuée (non réalisable si moins de 10 éléments/ mm^3) sera

effectué après centrifugation dans des tubes coniques stériles, et après coloration de May-Grünwald-Giemsa ou éosine-bleu de méthylène. Une large prédominance de polynucléaires est généralement observée dans les méningites bactériennes alors qu'elle est lymphocytaire dans les méningites virales,

Dans les deux cas Une coloration de Gram sur le culot de centrifugation du LCR doit être effectuée. Celle-ci augmente les performances de l'examen. Ces performances dépendent de la densité bactérienne, elle-même variable selon l'espèce en cause et la durée d'évolution de la méningite.

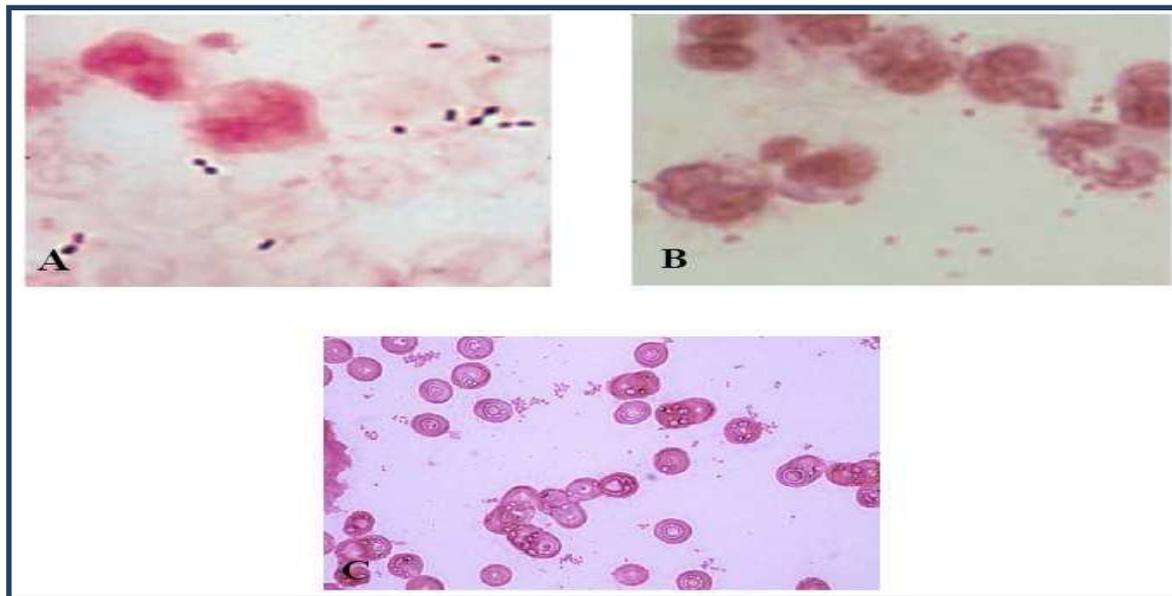


Figure 5 : Examen bactériologique direct du LCR après coloration de Gram

- **A** : *S. pneumoniae*,
- **B** : *N. meningitidis*,
- **C** : *H. Influenzae*,

2.3 La mise en culture :

Effectué systématiquement en premier temps afin d'éviter tout risque de contaminations du LCR en utilisant des milieux enrichies permettant la croissance des bactéries exigeantes responsables de méningites bactériennes :

- gélose au chocolat avec supplément vitaminique (polyvitex) (1 aérobie et 1 atmosphère enrichie en CO₂, incubée à 37°C

- Gélose au sang, incubée à 37°C sous une atmosphère de 5 à 10 % de CO₂. Ces milieux sont observés après 18 h et 48 h d'incubation à 37°C et conservés 5 jours.

Figure 6 : Photos des milieux des cultures ensemencées

2.4 L'identification des germes:

L'étude des cultures positives est faite par la détermination des caractères biochimiques de la majorité des bactéries il se fait à l'aide de tests d'orientation rapide : oxydase, catalase, coagulase...

A l'hôpital CHU Hassan II Fès en se basant sur l'examen des colonies, le Gram, l'oxydase et la catalase qui permettent de préciser l'orientation diagnostique qui détermine le choix de la galerie d'identification à ensemencer.

Cette étape d'identification est réalisée soit :

- **Par ensemencement d'une galerie biochimique adaptée :**

Est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.



Figure 7:
lecture des résultats d'une galerie d'identification

Ce principe a généré toute une gamme de galeries :

- API® 20 NE ou API® 32 GN pour les bacilles à Gram négatif oxydase positif ;
- API® Staph pour les *Staphylocoques* ;
- API® Listeria pour les *Listeria* ;
- API® NH pour les *Neisseria* et *Haemophilus* ;
- API® 20 A pour les bactéries anaérobies ;
- API® Strep pour les *Streptococcus* ;
- **Par des automates :**

L'automate utilisée au laboratoire de bactériologie CHU Hassan II c'est le phoenixTM « automated microbiology system » est conçu pour une identification rapide (ID) et un antibiogramme cliniquement significatif des bactéries pathogènes de l'homme. Le système comprend un instrument, des logiciels, des panneaux jetables, bouillons pour ID et un indicateur d'antibiogramme. L'instrument a la capacité de contenir 100 panneaux de tests. Les panneaux de tests jetables contiennent 136 puits de micro dilutions. Les panneaux sont en lecture en intervalle de 20 minutes. Les concentrations minimales inhibitrices, et les interprétations des catégories sont générées. Les résultats définitifs sont disponibles en 2 à 12 heures pour l'ID et 4 à 6 heures pour l'antibiogramme automate



Figure 8 : *N. meningitidis*, ensemencement en **Figure 9:** photo de l'automate Phoenix et aspect des colonies sur gélose au sang.

2.5 Etude de la sensibilité aux antibiotiques:

L'antibiogramme permet de tester sur milieu de culture, l'action des antibiotiques sur une souche bactérienne

♣ Principe :

Des disques de papier, imprégnés des antibiotiques à tester, sont disposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier ; après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de croissance

♣ Protocole :

Le test d'antibiogramme a été de diffusion en milieu gélosé réalisé Mueller-Hinton par la méthode concerné les souches isolées de la culture positive, ces souches ont été testées pour leur résistance à des antibiotiques appartenant à 6 familles :

Neisseriameningitidis : P, AMP ou AML, CRO ou CTX, Chloramphénicol, Rifampicine.

Haemophilus : P, AMP, AML, AMC, KF, CTX, GN, LEVO, NA, Te, Cip, Nor, Cotrimoxazol.

Pneumocoque : AMP, AML, AMC, OX, CTX , GN500, Op, VA, TEC, E, MY, SP, LEVO, SXT, Nor.

♣ Ensemencement et lecture :

A partir d'une culture de 24h sur milieu gélose ,on prépare une suspension en solution de l'eau physiologique stérile , par méthode d'écouvillonnage , c'est une technique à privilégier car elle évite les aérosols , à l'aide d'un écouvillon, on passe sur le bord de la boîte puis on ensemence en stries toutes la surface du milieu , après dépôt des disques d'antibiotiques à l'aide d'un pince stérile, la boîte est incubée à 37°C pendant 24h.

La lecture est faite qualitativement après l'incubation en mesurant le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne qui se matérialise par un halo claire autour des disques d'antibiotique et se comparant, pour chaque antibiotique au standard.

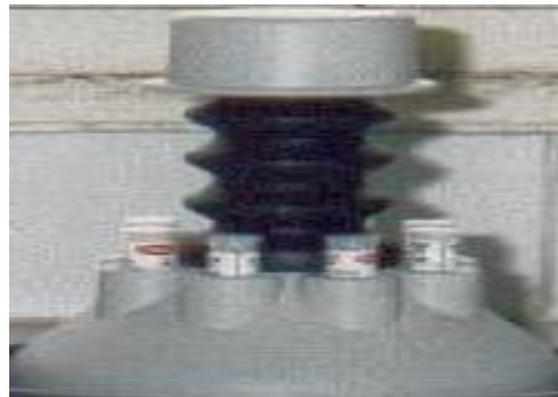




Figure10 : Cartouches Contient un antibiotique **figure11** : distributeur de disques à une concentration donnée

Lorsquela culture sera développée. On doit rechercher une bêtalactamase pour s'assurer de la présence de l'Haemophilus influenzae, rechercher une sensibilité diminuée à la pénicilline pour identifier la Neisseriameningitidis (méningocoque) ou détecter une résistance aux betalactamines pour juger de la présence du streptococcus pneumoniae

3. Analyse complémentaire :

Au même temps avec l'analyse bactériologique du LCR, l'analyse biochimique reste obligatoire et préliminaire pour toute interprétation des résultats de méningite. Cette analyse se base surtout sur La protéinorachie et la glycorachie.

Tableau2 : comparaison biochimique entre LCR normal et un LCR en cas de méningite.

	LCR Normal	Méningite
La protéinorachie	inférieure à 0,4 g/l.	Une hyperprotéinorachie
La glycorachie	supérieure à 60 % de la glycémie	une hypoglycoglycorachie



Résultats et Discussion

Les méningites bactériennes demeurent un grave problème de santé publique ; en effet elles représentent une cause majeure de mortalité et de morbidité et posent actuellement plus de problèmes thérapeutiques.

Cette étude analytique rétrospective a porté sur 18 mois (1er Décembre 2012 au 1er Mai 2014), elle est fondée sur le recueil des données à partir des fiches de renseignement accompagnant toute LCR obtenues de l'ensemble des patients ayant bénéficié d'une ponction lombaire aux urgences de l'hôpital CHU Hassan II de Fès.

Cette étude a été réalisée, dans le but de mesurer :

- La fréquence des méningites bactériennes chez les patients externes et hospitalisés ;
- La répartition des germes selon les services hospitaliers ;
- La répartition des germes responsables des méningites bactériennes et leur niveau de sensibilités vis-à-vis les antibiotiques testés.

I. Répartition des méningites :

La numération cellulaire a permis la différenciation entre méningites bactériennes et virale. Une large prédominance de polynucléaires est généralement observée dans les méningites bactériennes alors qu'elle est lymphocytaire dans les méningites virales. D'après les résultats de la culture, on observe que la majorité est révélée négative avec un taux de 95,9% (2220 cas), tant que les cultures positives représentent seulement 4,06% (94cas).

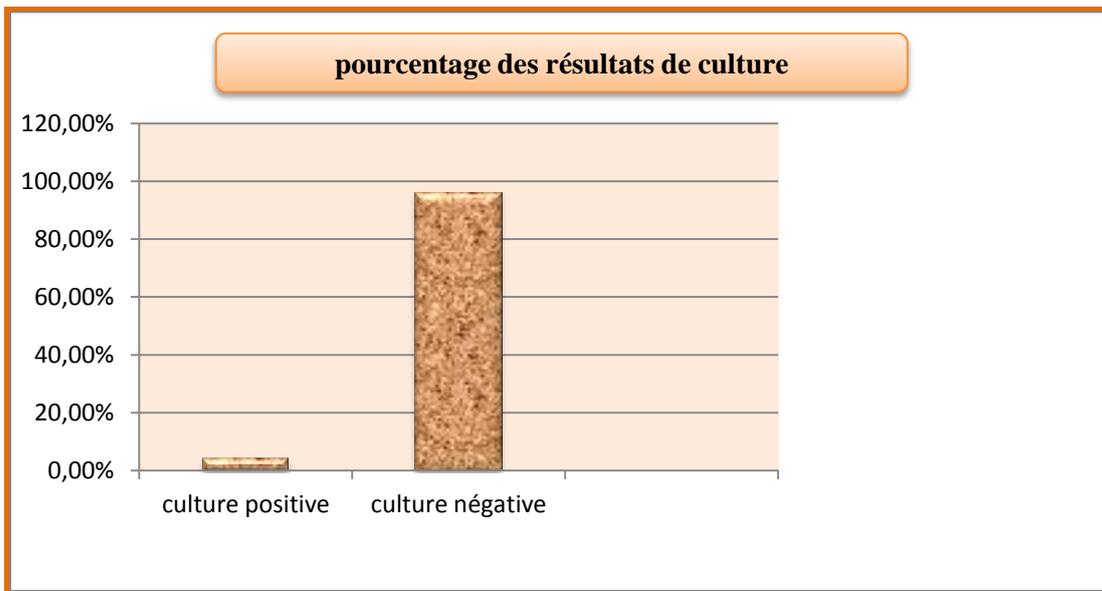


Figure12 : taux en pourcentage des résultats de culture.

1. Répartition des cas selon le sexe

2314 LCR ont été envoyés au laboratoire de bactériologie pour suspicion des méningites dont le sexe masculin représente 52.1% (49 cas) et le sexe féminin avec un taux de 47.9% (45cas). Il s'est avéré que la population la plus touchée par les méningites est de sexe masculin que les femmes, soit un ratio de 1.02 en faveur des hommes (Figure 13). Ces résultats sont proches à ceux observés par AUBERT (1986) au C.H.R.U. de Saint-Etienne) : 71% des hommes sont affectés par cette maladie par rapport à 29% des femmes.

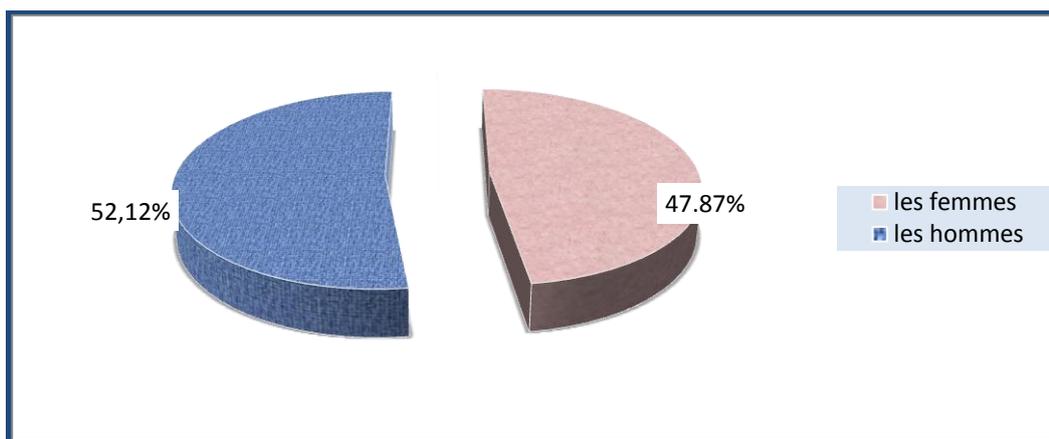


Figure13 : pourcentage des méningites suspectées selon le sexe

2. Répartition des cas de méningites selon les services hospitaliers

La répartition des LCR des patients selon les différents services permet l'évaluation des sujets les plus touchés par les méningites. On constate que le taux le plus élevé 45.7% (43 cas positifs) est représenté par les patients provenant du service de la chirurgie pédiatrique indiquant ainsi que les sujets les plus touchés sont les enfants. Au deuxième rang vient le service d'urgence pédiatrique avec un taux de 24.4% (23 cas positifs), suivie du service de réanimation adulte 22,3 (21 cas), le service d'urgence adulte 5,3% (5 cas) et finalement le service mère-enfant 2,1% (2 cas) (figure14).

Dans cette étude, l'âge des patients n'a pas été exploité car il n'a été mentionné sur la feuille de prescription, mais d'après les résultats de la répartition de la série d'étude selon les services il apparait que les nouveaux nés-enfants sont les plus touchés par la méningite bactérienne.

Les données de cette étude corroborés à quelque différence près de celle l'apporté par une étude faite à l'hôpitalau CHU de Yopougon en Côte d'Ivoire, 1995–1998, par Akoua-Koffi et ces collaborateurs,ils montrent que la majorité des cas de méningites provenaient des services de néonatalogie et de pédiatrie 85,4%.

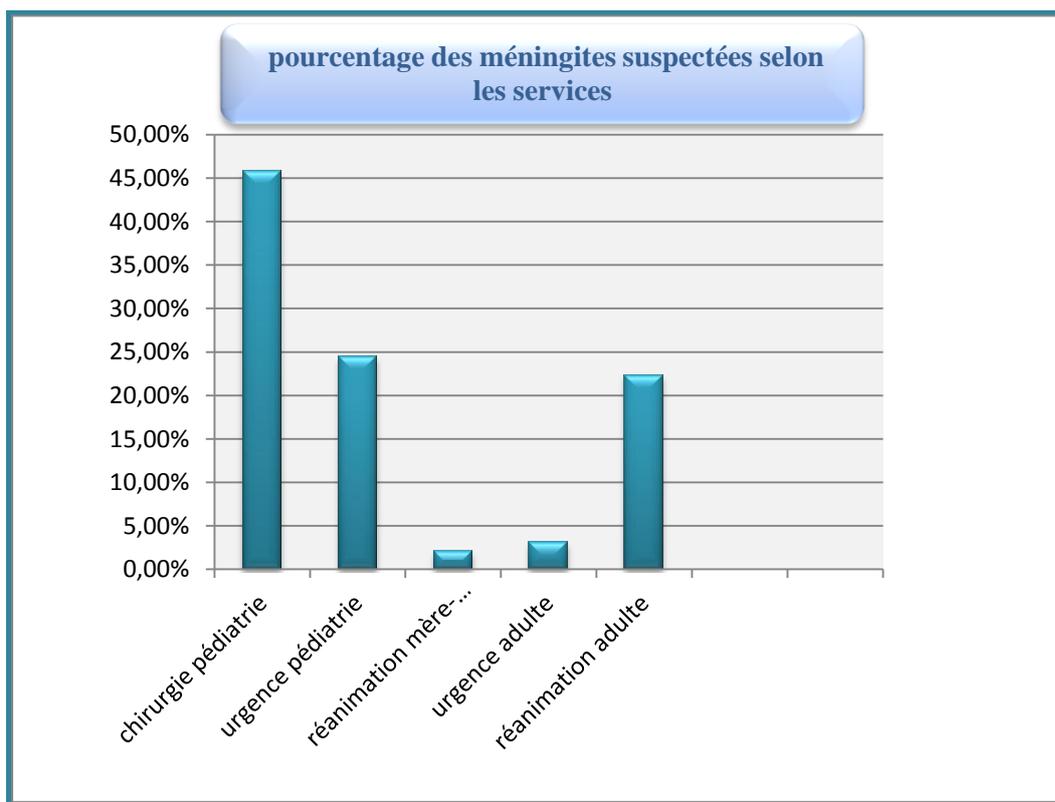


Figure 14: répartition des méningites suspectées selon les service hospitalier

II. l'examen cyto bactériologique du LCR :

1. Examen macroscopique du LCR

Notre étude montre que, selon l'aspect du LCR, 64,8% des cas révèlent un aspect trouble (52 prélèvements), 19,3% un aspect clair (15 cas), 8,3% un aspect hémorragique (16 cas) et finalement 7,6% un aspect purulent (11 cas) (figure15).

Des résultats similaires ont été observés en Tunisie (1999–2006), Ben Haj Khalifa à trouver que sur 191 cas de méningites bactériennes prouvés, 98 LCR (51,30%) ont un aspect trouble. ce qui montre que l'aspect trouble de LCR est un signe de méningites bactériennes dû à l'hyperleucocytose.

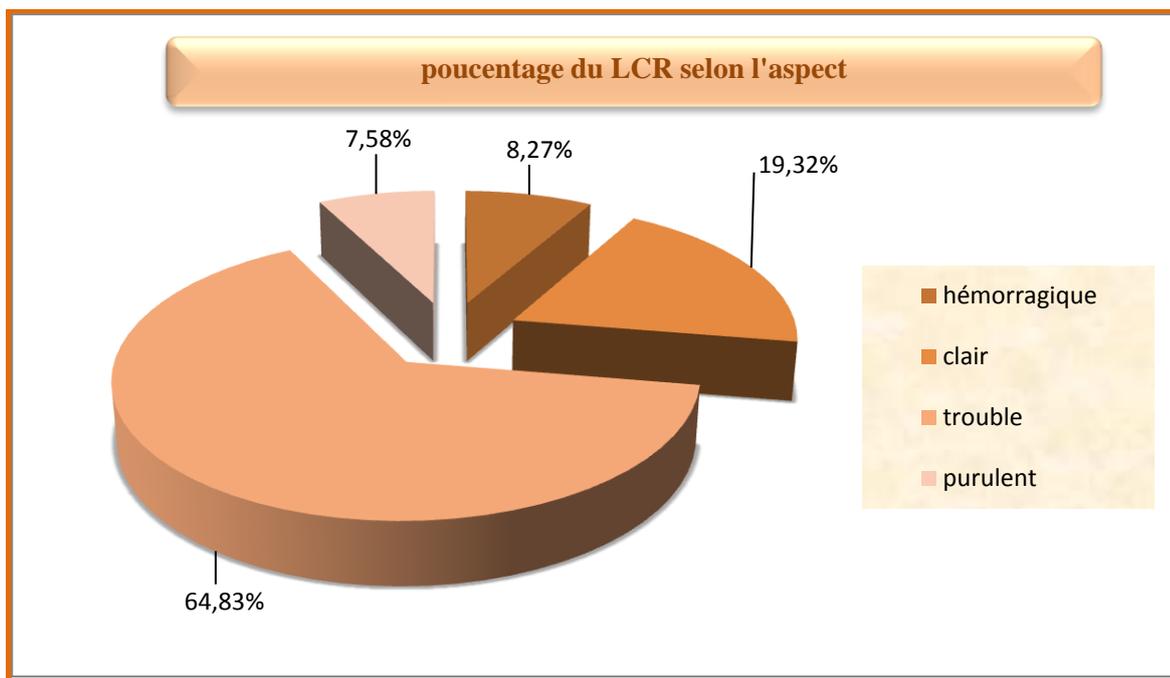


Figure 15: pourcentage de LCR selon l'aspect

2. Examen bactériologique du LCR :

2.1. l'identification des germes responsables

Le nombre de bactéries isolées à partir du LCR était de 8. D'après les résultats, on remarque que la plus grande partie des méningites est causées par *Streptococcus pneumoniae* avec un taux de 20,21% (19 de cas); suivie de ensuite par *Acinetobacter baumannii* avec un taux de 19,14% (18 de cas); *Pseudomonas aeruginosa* avec un taux de 18,02% (17 de

cas); *Nisseriameningitidis* avec un taux de 18,02% (17 cas); et finalement *Klibsiellapneumoniae* avec un taux de 14,89% (14 cas) (figure16).

Le premier fait qui se dégage de ces résultats de culture est l'existence parmi les bactéries responsables de méningites les deux chefs de file : *Streptococcus pneumoniae* et *Nisseriaméningitidis* les données de cette étude corroborent celle l'apporté par H. Dabernat, J.p. Stahl, en France 2010 ,ils montrent que *Streptococcus pneumoniae* et *Neisseriameningitidis* sont les plus fréquents (respectivement dans 43 % et 35,2 % des cas). Une deuxième caractéristique que l'oppose aux résultats obtenus en 2010 au même hôpital c'est l'absence de *Haemophilus influenzae* et *Listeria monocytogenes*.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter Baumannii* sont considérés comme le leader des infections nosocomiales à l'hôpital CHU Hassan II de Fès ce qu'on peut observer aussi dans l'étude de 2010 qui montre que 25% des germes isolés étaient d'*Acinetobacter Baumannii*.

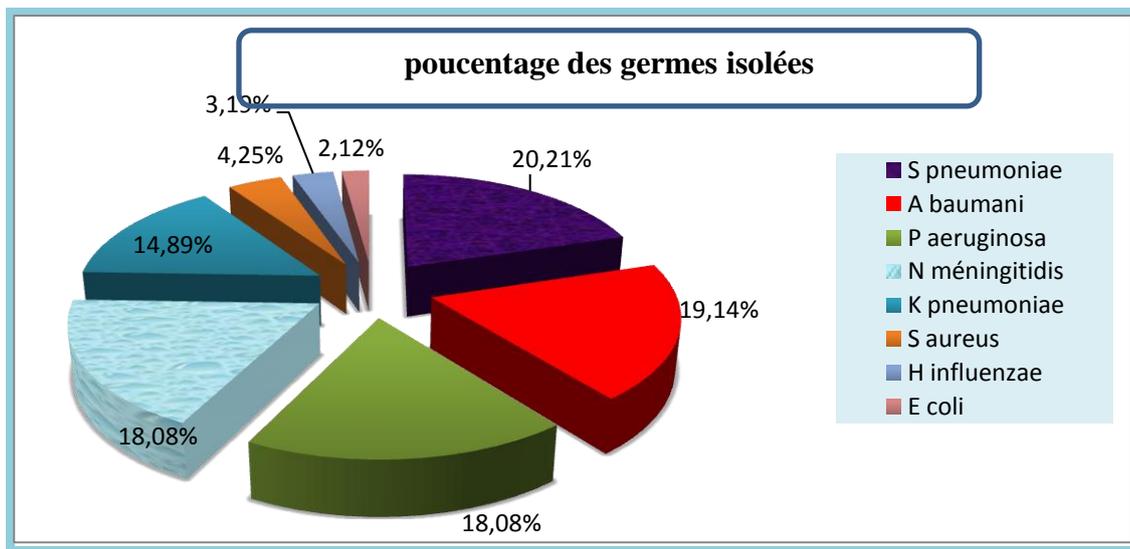


Figure16 : répartition du LCR selon le type de bactérie isolée

III. Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

Le tableau 8 récapitule les différents antibiotiques testés vis à vis des germes isolés.

Tableau N°3: Les antibiotiques testés pour les germes isolés

Les germes	Antibiotiques testés
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	AMP, AML, AMC, OX, CTX, GN500, Op, VA, TEC, E, MY, SP,

	LEVO, SXT, NOR.
<i>Acinetobacter Baumannii</i> / <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	AK,ETP,GN,CIP,NOR,CT,SXT,TE,NA,CAZ,IPM,ATM, PIP,TIC,TZP,TIM,FF
<i>Nisseria Méningitidis</i>	P, AMP, AML, CRO, CTX, CIP, SP, OX,
<i>Klibsiella Pneumoniae</i>	AMP,AML,CFM,KF,CTX,CRO,CAZ,IPM,AMC,AK,ET P,GN,CIP,NOR,CT,SXT,TE,NA

✚ **Pour *Streptococcus pneumoniae* :**

le profil de sensibilité de *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques a été assez diversifié , le taux de sensibilité est élevé vis-à-vis de la plupart des antibiotiques testés a été comme suit : Erythromycine (100 %) , et une sensibilité conservée a un taux de 94,11% pour les antibiotiques suivants : Ampicilline , céfotaxine , Teicoplanine , Gentamicine, Lincomycine , Spiramycine et une sensibilité diminuée (88,23%) pour Ampicilline , Amoxicilline , Oxacilline et le norfloxacine (figure17).

Y. VEZARD, M. CASTETS (1970), ont montré une bonne sensibilité vis-à-vis des macrolides : Erythromycine (90.2%), Spiramycine (88.9%), les souches testées étaient sensibles à la famille des pénicillines A (70%) : Ampicilline, Amoxicilline.

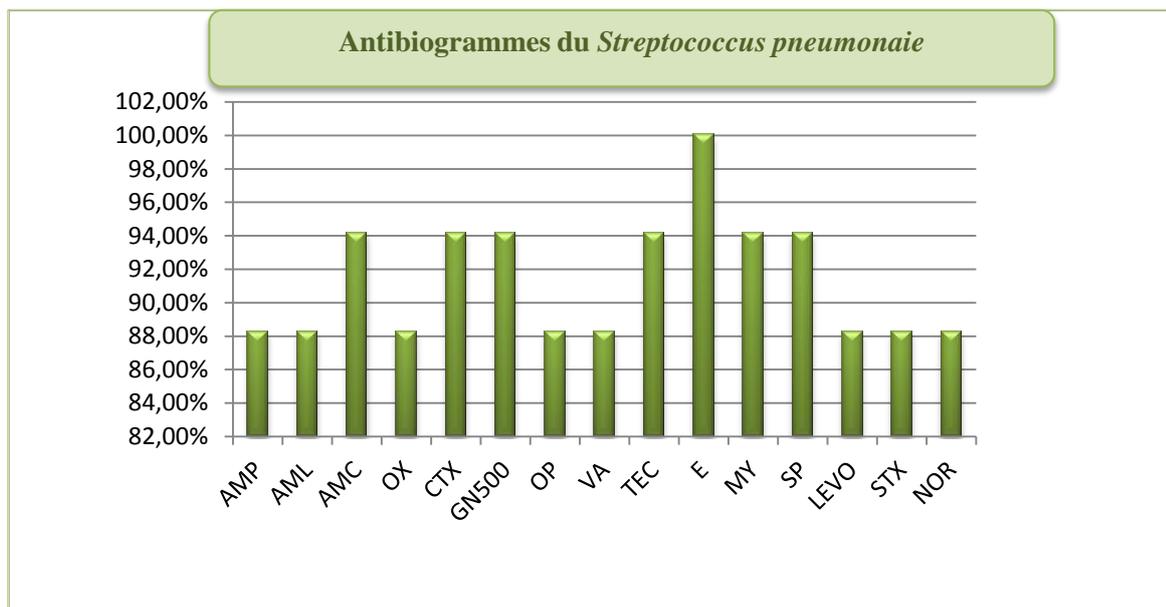


Figure 17 : pourcentage de sensibilité du *Streptococcus pneumoniae* aux antibiotiques

✚ Pour *Nisseriameningitidis* :

L'étude de profil de sensibilité des souches de *N. méningitidis* isolées a démontré une sensibilité élevée pour la famille des céphalosporines de 3^{ème} génération (100%) : céfotaxime, céftriaxone et la famille des quinolones (92,85%).

Une sensibilité réduite pour la famille des pénicillines (85,71%) : Ampicilline, Amoxicilline. Et présente une sensibilité diminuée pour l'oxacilline (57,14%) et spiramycine (42,85%) (figure 18). Alors que la sensibilité des souches isolées en CHU Hassan II en 2010, étaient toutes sensibles aux antibiotiques testés sauf une qui était résistante à la pénicilline.

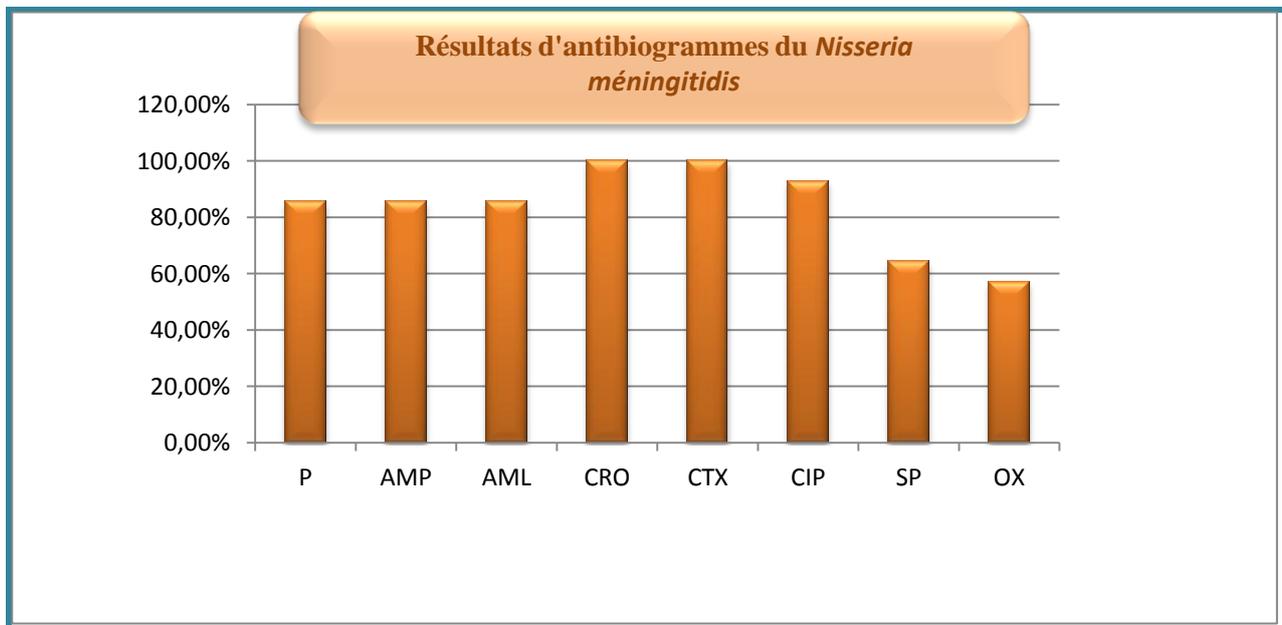


Figure 18: pourcentage de sensibilité du *Nisseriameningitidis* aux antibiotiques testés

✚ Pour l'*AcinetobacterBaumanni* :

L'*Acinetobacterbaumanni* est une bactérie opportuniste fréquemment résistante à de nombreux antibiotiques, responsable d'infections nosocomiales le plus souvent dans des services accueillant des patients fragilisés, considérée comme responsable de méningites nosocomiales.

La figure montre le profil de sensibilité des souches de *Acinetobacterbaumanni* isolées, à la colistine (93,33%), Amikane (73,33%), sulfaméthoxazole (60%), Imipénème (53,33%), et une sensibilité diminuée vis-à-vis de Ticarcilline (13,33%). Des résistances très élevées des souches *A.baumanni* ont été signalées pour la famille des Aminosides, des Quinolones (figure 19)

.contrairement à ce qu'on peut observer en 2010, l'étude montre que les souches d'*Acinetobacterbaumanni* étudiées ont un taux de résistance important vis-à-vis des Ticarcilline (60%) et une résistance élevées vis-à-vis au reste .

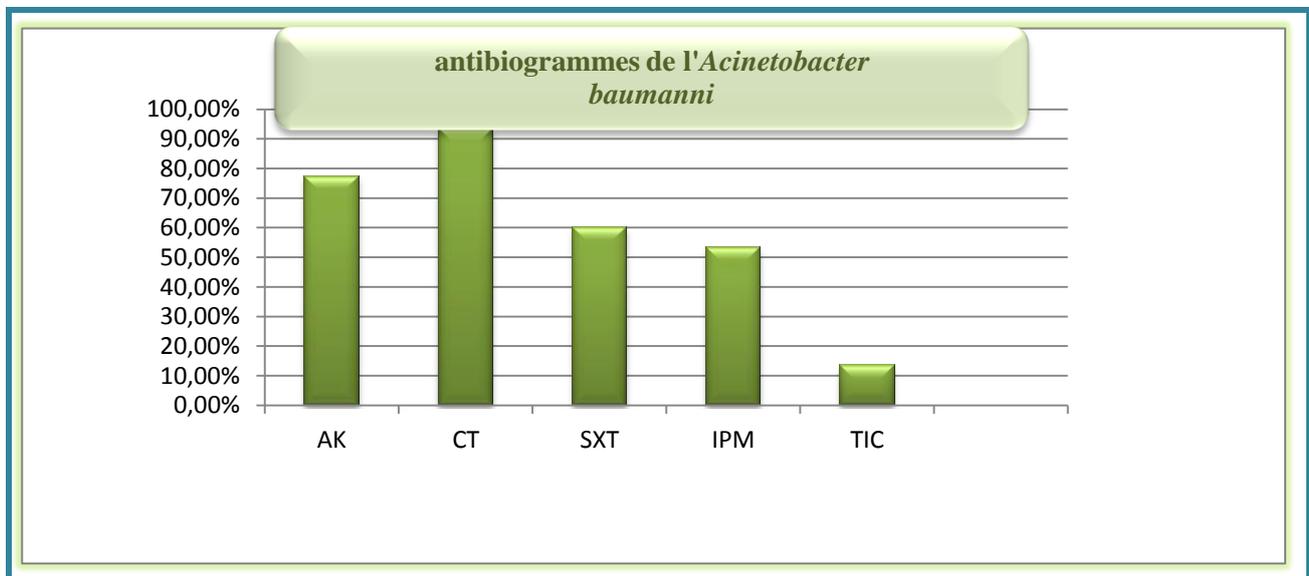


Figure19 : pourcentage de sensibilité de l'*AcinetobacterBaumannii*aux antibiotiques

✚ **Pour *Klibsiellapneumoniae* :**

la figure ci-dessous illustre les résultats d'antibiogramme des souches de *Klibsiellapneumoniae* isolées, La sensibilité est de 92,30% avec toutes les souches testées pour l' Amikacine, la sensibilité globale des souches vis-à-vis des différents antibiotiques testés est : Imipénème et Colistine (76,92%) ,Céfixime , Ampicilline et Amoxicilline (7,69%) (figure20). Contrairement aux résultats obtenus en 2010, au même hôpital, *Klibsiellapneumoniae* n'était pas présente.

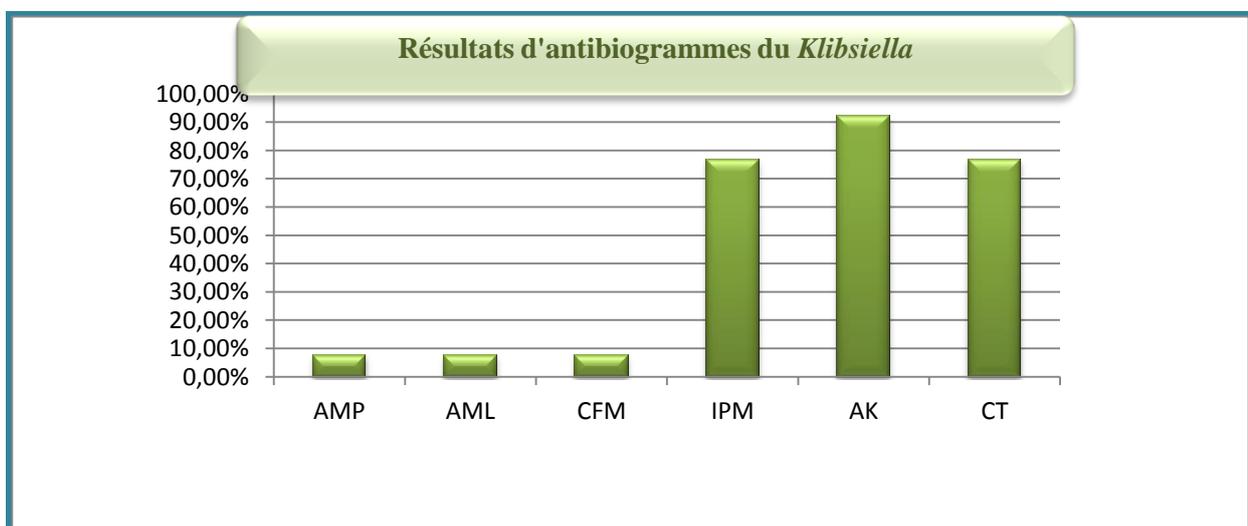
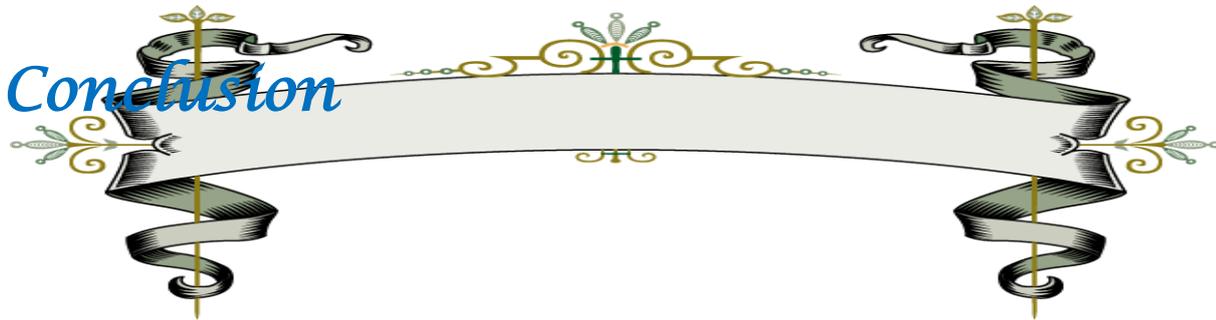


Figure20 pourcentage de sensibilité du *KlibsiellaPneumoniae* aux antibiotiques testés.



Le diagnostic d'une méningite suspectée bactérienne repose sur un faisceau d'arguments et sur une confrontation clinico-biologique. Aucun test pris séparément et hors contexte clinique ne peut à lui seul affirmer le diagnostic.

L'analyse du LCR par différentes méthodologies et par différentes techniques nous a permis de mettre en évidence le suivant :

- D'après les résultats de cette étude, il s'est avéré que la population la plus touchée par les méningites est de sexe masculin avec un taux de 52,1%.
- 45,7% sont les patients provenant du service de la chirurgie pédiatrique, suivie de patients provenant du service d'urgence pédiatrique avec un taux de 24.4%, du service de réanimation adulte 22,3%, du service d'urgence adulte 5,3% et finalement le service mère-enfant 2,1%. Ceci montre que les nouveaux nés-enfants sont les plus touchés par la méningite bactérienne.
- Selon l'aspect du LCR, 19,3% des cas révèlent un aspect claire, 64,8% un aspect trouble, 8,3% un aspect hémorragique et 7,6% un aspect purulent.
- D'après les résultats de la culture bactérienne, on observe que la majorité est révélées négative avec un taux de 95,9% et les cultures positives représentent seulement 4,06%.
- L'identification du germe responsable révèle que le nombre de bactéries isolées à partir du LCR était de 5 espèces différentes : *Streptococcus pneumoniae*20,21%, *Acinetobacterbaumanni*(19,14%), *Pseudomonas aeruginosa*, (18,02%) *Nisseriameningitidis*(18,02%) et *Klibsiellapneumoniae*(14,89%).

□ cette étude souligne aussi la présence d'un taux de résistance vis-à-vis des antibiotiques chez certaines espèces (*Pseudomonas aeruginosa*, l'*Acinetobacter Baumannii*, *Klinsiella pneumoniae*), qui sont responsables de infections nosocomiales. Les niveaux de résistance atteints vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques et l'émergence de souches multirésistantes, doivent soutenir les praticiens dans l'usage prudent et à bon escient des antibiotiques.

De nouvelles perspectives peuvent être envisagées par des tests supplémentaires en travaillant sur l'agglutination des particules de latex est adaptée à la détection des antigènes bactériens présents dans le LCR de patients suspects de méningites d'origine bactérienne. Ces tests permettent de détecter la plupart des germes responsables d'infection du système nerveux central mais ils manquent de sensibilité, et la méthode d'amplification génétique par PCR permettant un diagnostic quasi certain et sans culture.



ANNEXES

Annexe I :

Matériels, réactifs et milieux de culture

♣ Milieux de culture :

1. Gélose PVX :

La gélose Chocolat PolyViteX est un milieu d'isolement plus particulièrement destiné à la croissance des souches exigeantes appartenant aux genres *Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus pneumoniae*.

Composition :

Peptone de caséine (bovifn).....	7,5
Peptone de viande (bovin ou porcin)	7,5
Amidon de maïs.....	1
Phosphate dipotassique	4
Chlorure de sodium	5
Hémoglobine (bovin).....	10
Agar.....	10
PolyViteX.....	10 ml

Après incubation, observer la croissance bactérienne. L'identification du ou des microorganismes isolés doit être réalisée grâce à des tests biochimiques voire immunologiques.

2. Gélose Columbia au sang COS:

La gélose Columbia est un milieu d'isolement destiné à faciliter la croissance des microorganismes exigeants. Additionnée de sang de mouton, elle constitue un apport nutritif très riche adapté à la croissance de la majorité des espèces bactériennes quel que soit leur métabolisme. Elle contient un mélange de peptones particulièrement adapté à la culture des micro-organismes exigeants (streptocoques, *Listeria* ...). La présence de sang de mouton permet l'expression de l'hémolyse qui est un critère de base de l'orientation de l'identification bactérienne. Cette gélose convient également pour l'isolement des germes anaérobies.

Composition :

Formule théorique en g/l d'eau purifiée.

Ce milieu peut être ajusté et/ou supplémenté en fonction des critères de performances imposés :

Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin)	10
Hydrolysate de protéines animales (bovin ou porcin).....	10
Peptone de coeur (bovin ou porcin).....	3
Amidon de maïs.....	1
Chlorure de sodium	5
Agar.....	13,5
Sang (mouton).....	50 ml



Lecture et interprétation :

Après incubation, observer la croissance bactérienne. Noter la présence éventuelle d'hémolyses caractéristiques:

- hémolyse α : coloration verdâtre autour de la colonie.
- hémolyse β : zone d'éclaircissement autour de la colonie ou sous la colonie.

L'identification du ou des micro-organismes isolés doit être poursuivie par des tests biochimiques voire immunologiques.

Les hémolyses observées sur les souches testées après 24 heures d'incubation sont les suivantes :



· Hémolysé β pour les 17 souches de *Streptococcus pyogenes* et pour 3 des 4 souches de *Listeria* (*L. monocytogenes* et *L. ivanovii*).
Remarque : L'hémolysé β n'est pas spécifique de



ces espèces : certains *staphylocoques* et *Streptococcus agalactiae* ont également donné des hémolyses β .

· Hémolysé α pour les 11 souches de *Streptococcus pneumoniae* testées.

Après 24h d'incubation à 37°C



3. Milieu MH :

C'est un milieu utilisé surtout pour faire l'antibiogramme d'une bactérie.



♣ Matériels utilisés :

- Lames
- Lamelles
- Pipettes pasteur stériles
- Boîtes de pétrie de 90mm de diamètre en plastique
- Microscope binoculaire avec les objectifs ($\times 10$, $\times 40$, $\times 100$)
- Bec benzène

- Jarre avec générateur de CO₂ (10%)
- Etuve à température réglable
- Autoclave
- Réfrigérateur
- L'oesse et pince
- Cellule de malasse

♣ Réactifs :

- Eau physiologique stérile
- Réactifs pour la coloration de Gram
- Réactifs pour la coloration MGG

Annexe II :

coloration utilisées

1. Coloration MGG :

La coloration de **May-GrünwaldGiemsa**, parfois également appelée coloration de **Pappenheim** est une méthode de coloration utilisée pour différencier les cellules du sang lors des préparations cellulaires (cytologie).

Il repose sur l'action combinée de deux colorants neutres:

- Le **May-Grünwald**, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène.
- Le **Giemsa**, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels précipitent (l'èosinate de méthylène et azurs de méthylène) et se fixent électivement sur les constituants cellulaires.

Mode opératoire :

- Déposer 10 à 15 gouttes de May-Grünwald sur le frottis et couvrir pour éviter l'évaporation. Pendant 3 mn. C'est la Fixation.
- Déposer 10 à 15 gouttes d'eau tamponnée et mélanger par rotation de la lame. 1 mn
- Égoutter
- Recouvrir de Giemsa dilué 15 mn. C'est la coloration.
- Égoutter
- Laver à l'eau neutre.
- Sécher au papier Joseph.

Résultat :

- Les noyaux sont de bleu à violet-noir
- Les granulations des granulocytes basophiles sont bleu-noir
- Les hématies sont beige-rosé, les granulations des granulocytes éosinophiles sont orangées.
- Les granulations des granulocytes neutrophiles sont violet-lilas.
- Les granulations des grands lymphocytes sont pourpres.

2. Coloration du bleu de Méthylène

Principe

La coloration au bleu de méthylène (BM) est une coloration très simple qui permet d'observer les bactéries, les champignons, mais aussi les cellules : les globules blancs, ces derniers se colorent en bleu car leurs noyaux est basophiles tandis que le BM est un colorant basique. Elle permet de renseigner sur :

- la forme des bactéries
- la taille
- le mode de regroupement

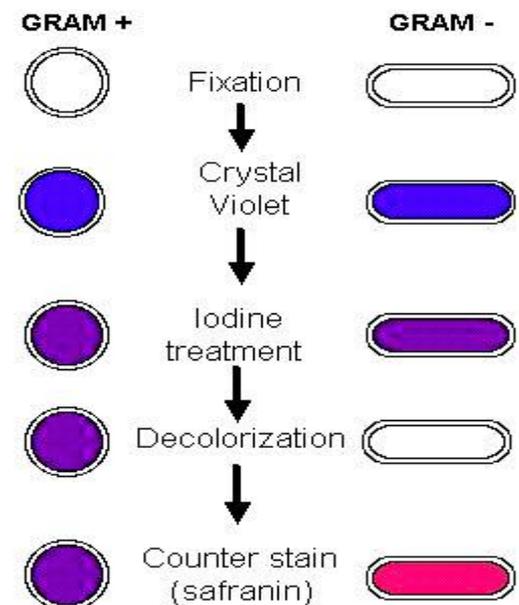
3. Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne. Elle permet de renseigner sur : Le type Gram + ou Gram -, la forme des bactéries, la taille, le mode de regroupement

Technique

- Réaliser un frottis et le fixer.
- plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- laver la lame à l'eau distillée.
- plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute : fixateur
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement a l'eau distillée
- plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.



Référence

bibliographique

- AVRIL. J.L, DABERNAT. H, DENIS. F, MONTEIL. Bactériologie Clinique Ellipes, Paris 1999 2e éd.
- Bégué P. Astruc J .Carrière J-P. :Méningites à liquide clair *in:Pathologie infectieuse de l'enfant*. Masson,édit. Paris 1999. 465-471.
- Belabbes H, El Mdaghri N, Redouani A, Benbachir M. Sérotypes et sensibilité aux antibiotiques des Pneumocoques isolés au CHU de Casablanca entre 1994 et 1997. Maroc Méd 2000;22:265–71.
- Benouda A, Mouline S, Alaoui MA. Situation de la sensibilité du Pneumocoque à la pénicilline G au centre hospitalier Rabat. Biologie-infectiologie 1996;II:18–22.

- Bernard Ivanov. Les méningites bactériennes. Progrès dans le développement de vaccins.
- Berthé A.N. Aspects cliniques et bactériologiques des méningites purulentes en Bruno Hoen et de Hoang Vu Thien, communication lors de la 17e Conférence de consensus en thérapeutique anti-infectieuse, sur le thème “Prise en charge des méningites bactériennes aiguës communautaire (à l’exclusion du nouveau-né)”, novembre 2008, Paris.milieupédiatrique.Thèse Méd. Bamako, 1979 n°35.
- Comité de l'antibiogramme de la Société française demicrobiologie. Communiqué 2010. 17 e Conférence de consensus en thérapeutique antiinfectieuse «Les méningites purulentes communautaires » ; SPILF 2008 . Med Mal Inf 2009 ; 39 (3) : 145 –210 .
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Francaise de Microbiologie. 2006: C.J. Soussy.
- Canica M, Dias R, Nunes B, Carvalho L, Ferraira A, the MeningococciStudy Group. Invasive culture-confirmedNeisseriameningitidisin Portugal: evaluation of serogroups in relation to different variablesand antimicrobialsusceptinility (2000–2001). J Med Microbiol2004;53:921–5.
- Comité de l'antibiogramme de la Société française demicrobiologie . Communiqué2010 .
- DENIS F., MOUNIER M., LAVAUD A. - Le diagnostic rapide des mningitesbactrriennes. Rev Fr Lab. 1986 ; 148 : 51-7.
- DENIS F., MOUNIER M. - Examen cytobactrriologique du liqnidecrphalorachidien. In "BactrriologieMrdicale - Techniques usuelles". 1987, B. Carbonnelle, F. Denis, A. Marmonier, G. Pinon, R. Vargues Ed. SIMEP, Paris : 47-51.
- DE SAINT-MARTIN L., NASSIF X. — Physiopathologie des méningitesbactériennes aiguës purulentes. Med. Therap., 1995, 5,527-532.
- Dabernat.H ,StahlJ.p.Goulet.V et le groupe d'etude de la Ligue francaise pour la prevention des maladies infectieuses, méningites bactériennes en France ,étude dans six départements métropolitains au 1995-1997.
- ETIENNE J et PICQ JJ. Structure antigénique, marqueurs épidémiologiqueset facteurs de virulence du méningocoque. Med Mal Inf 1984 ; 14 : 19-26.

- Figuigui S, Benbella I, Khalki H, Taghouti A, Yahyaoui G. profil bactériologique des méningites bactériennes au CHU Hassan II, Fès. Laboratoire de microbiologie.2010
- GENDREL D . Apport des données biochimiques dans lediagnostic des méningites purulentes communautaires Med Mal Inf 1996 ; 1068 –72 .
- Groupe REMIC de la Société française de microbiologie. Examencytochimique et bactériologique d'un liquide céphalorachidien. REMIC (Référentiel en Microbiologie Médicale). Montmorency: 2M2: 1998. p. 49–52.
- GUIBOURDENCHE M et RIOU J. Méthodes de laboratoire : Neisseria Branhamella. Institut Pasteur, Paris. 1994.
- INSERM. Méningites bactériennes. Stratégie de traitement et de prévention. Paris 1996, 167p
- KANE Ahamadalmadaniou Aspects épidémiologiques et bactériologiques des méningites purulentes au Mali de 1979 à 1999. Thèse pharm 2003.
- Kaplan SL, Mason Jr EO. Management of infections due to antibioticresistant Streptococcus pneumoniae. Clin MicrobRev 1998;11:628–44.
- LECAMUS.J.L, TOUZE, PICQ.J.J, AUBRY. P ,Les infections à méningocoques .EMC. Maladies Infectieuses ; Tome 2, 8013A10 9-1989.
- MODAI J. - Traitement des meningites purulentes. Rev. Prat., 1987, 37, 1239-1244.
- MICHARD D., LEPOUTRE A. — Méningites à méningocoque et méningococcémies en 1991. BEH, 1993, 55-56.
- MODAI. J. Méningites bactériennes .Maladies Infectieuses - 1988 - Spécial Mai- 327-33
- NICOLAS P. Les marqueurs utiles au suivi épidémiologique des méningocoques. Med Trop 2004 ; 64 : 215.
- VEZARD.Y , CASTET.M , SAMB .A. Bactériologie des méningites au centre hospitalier de Fann à Dakar. Médecine et Maladies Infectieuses. t975 - 5 - 9 - 473 & 476

17 e Conférence de consensus en thérapeutique antiinfectieuse «Les méningites purulentes communautaires » ; SPILF 2008 . Med Mal Inf 2009 ; 39 (3) : 145 –210 .