

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (MESRS)**

**République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi**

**UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO**



U.S.T.T.B

FACULTE DE PHARMACIE



ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

N° _____ /

THESE

**SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX
ANTIMICROBIENS DES SOUCHES DE KLEBSIELLA
PNEUMONIAE ISOLEES AU LABORATOIRE RODOLPHE
MERIEUX DE 2016 A 2017**

**Présentée et soutenue publiquement le 29/06/2018 devant la
Faculté de Pharmacie**

Par : Mlle Fatoumata Mariam DAFPE

Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Pr Soukalo DAOU

Dr Lassina Gadi TIMBINE

Co-directeur: Dr Brehima GUINDO

Directeur : Pr Souleymane DIALLO

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016-2017

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE MAITRE DE CONFERENCES

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA MAITRE DE CONFERENCES

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. SEYDOU COULIBALY ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : M. FEMALE DIONSAN CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

M. Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
M. Boulkassoum	HADARA	Législation
M. Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
M. Daouda	DIALLO	Chimie générale & minérale
M. Massa	SANOGO	Chimie Analytique
M. Moussa	HARAMA	Chimie organique
M. Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie
M. Brahima	KOUMARE	Bactériologie-virologie

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Bakary M.	CISSE	Biochimie
M. Abdoulaye	DABO	Biologie/parasitologie Chef de DER
M. Alassane	DICKO	Santé publique

2. Maître de conférences

M. Flabou	BOUGOUDOOGO	Bactériologie-Virologie
M. Boubacar	TRAORE	Parasitologie-Mycologie
M. Mounirou	BABY	Hématologie
M. Bourèma	KOURIBA	Immunologie
M. Mahamadou	DIAKITE	Immunologie
M. Souleymane	DIALLO	Bactériologie-Virologie
M. Ousmane	KOITA	Parasitologie-Moléculaire
M. Abdoulaye	DJIMDE	Microbiologie-Immunologie
M. Abdoulaye	TOURE	Entomologie Moléculaire-Médicale
M. Akory AG	IKNANE	Santé publique/Nutrition

3. Maître assistant

Mme Fanta	SANGHO	Santé Communautaire
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Seidina Aboubacar Samba	DIAKITE	Immunologie
M. Charles	ARAMA	Immunologie
M. Modibo	DAOU	Immunologie
M. Issa	DIARRA	Immunologie
M. Klétigui Casmir	DEMBELE	Biochimie clinique
M. Yaya	GOITA	Biochimie clinique
M. Samba Adama	SANGARE	Bactériologie-Virologie
M. Modibo	DIARRA	Nutrition

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie chimique
M. Elimane	MARIKO	Pharmacologie Chef de DER

2. Maître de conférences

M. Benoît Yaranga	KOUMARE	Chimie analytique
M. Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

3. Maître assistant

M. Sékou	BAH	Pharmacologie
----------	-----	---------------

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Mody	CISSE	Chimie thérapeutique
M. Ousmane	DEMBELE	Chimie thérapeutique
M. Mahamadou	TANDIA	Chimie analytique
M. Madani	MARIKO	Chimie analytique
M. Tidiane	DIALLO	Toxicologie
M. Blaise	DACKOOU	Chimie analytique

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
-----------	--------	----------------

2. Maître de conférences

M. Saibou	MAIGA	Législation Chef de DER
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie

M. Alou Amadou KEITA Galénique

3. Maître assistant

M. Yaya COULIBALY Législation

M. Loséni BENGALY Pharmacie Hospitalière

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Bacary Moussa CISSE Galénique

M. Bourama TRAORE Législation

M. Hamma Boubacar MAIGA Galénique

M. Hammadou Abba TOURE Bromatologie

M. Adama DENOU Pharmacognosie

M. Mahamane HAIDARA Pharmacognosie

M. Issa COULIBALY Gestion

M. Souleymane DAMA Sciences Pharmaceutiques

M. Antoine DARA Sciences Pharmaceutique

M. Balla Fatogoma COULIBALY Pharmacie Hospitalière

M. Karim TRAORE Sciences pharmaceutique

DER DES SCIENCES FONDAMENTALES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Mahamadou TRAORE Génétique

M. Mamadou KONE Physiologie

M. Sékou Fantamady TRAORE Biologie-Génétique-Zoologie

2. Maître de conférences

M. Mouctar DIALLO Biologie/Parasitologie

M. Kaourou DOUCOURE Physiologie

M. Lassana DOUMBIA Chimie minérale

M. Mamadou CISSE Biologie Végétale

3. Assistant/Attaché de recherche

M. Moussa KONE Chimie organique

M. Amidou DOUCOURE Chimie organique

M. Seydou Sassou COULIBALY Biochimie

M. Oumar GUINDO Biochimie

M. Mamadou Lamine DIARRA Botanique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

M. Bouba DIARRA Bactériologie

M. Boubacar	KANTE	Galénique
M. Yaya	KANE	Galénique
M. Moussa	SACKO	Biologie
M. Atimé	DJIMDE	Bromatologie
M. Boubacar	ZIBEIROU	Physique

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr Babacar	FAYE	Pharmacodynamie
Pr Amadou	DIOP	Biochimie
Pr Pascal	BONNABRY	Pharmacie Hospitalière

DEDICACES

Je rends grâce :

- **A l'éternel, le Tout Puissant (ALLAH)**

A lui tout ce qui est dans les cieux et sur la terre. Nul ne peut intercéder auprès de lui, qu'avec sa permission. Et il est le très haut et le très miséricordieux.

Je te rends grâce pour les bienfaits dont tu m'as comblée jusqu'à présent et te prie de m'en accorder de nouveaux qui correspondent aux besoins de mon évolution.

- **Au Prophète Mohamed** (paix et salut sur lui)

- **A mon père** : Sidy Ibrahim Daffé

Tu es l'une des deux personnes grâce à qui je suis à ce stade. Ma source d'inspiration unique, école de mon enfance, qui a été mon ombre pour toutes les années d'études et à mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour que je réussisse, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner de l'aide et à me protéger. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis à mon éducation et à ma formation. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.

- **A ma mère** : Aissata Koné

Si je suis là aujourd'hui à un pas de mon diplôme de Doctorat en Pharmacie, c'est grâce à toi maman et à ton courage, tes conseils, à ton soutien inconditionnel et à ta bénédiction. Merci pour toute la joie que tu as apportée dans ma vie. Merci pour chaque rêve que tu as fait ce réalisé. Merci d'être celle qui ma relevée quand je ne pouvais pas y arriver, d'être celle qui ma tenue stable, d'être celle qui ne m'as jamais laissé tomber et celle qui a vu le meilleur en moi et qui ma donner la foi. Merci pour tout l'amour que j'ai trouvée en toi maman. Je te serais éternellement reconnaissante. Que Dieu tout puissant te garde et te procure santé, bonheur et longue vie.

- **A mes frères et sœurs :** Coumba Sidy Daffé, Hawa Sidy Daffé, Mohamed Sidy Daffé, Mady Keba Sidy Daffé et Madina Sidy Daffé

Vous êtes les frères et sœurs les plus formidables du monde. Que ces modestes lignes vous servent de témoignage de mon affection et attachement indéfectibles au lien sacré de la famille.

- **A mes oncles et tontons :**

Chacun de vous a eu à jouer un rôle dans ma vie. Puisse à cet instant, chacun de vous recevoir le fruit de ses intentions.

Particulièrement : Mamou Daffé, Mamadou Daffé et Mohamed Camara (paix à son âme)

- **A mes tantes :**

Merci pour votre amour pour vos conseils et pour votre soutien

Trouvez en ce document le fruit de vos encouragements et de votre attachement.

Particulièrement à ma tante Evelyne Akoko, Danielle Akoko, Macoura Mariama Camara Mariam Camara et Aissata Daffé

- **A mes grands-pères :** Keba Daffé (paix à son ame), Karamoko Camara et Abdoulaye Daffé

Merci pour votre soutien et pour votre aide durant toute ma vie estudiantine.

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, recevez à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

- **A mes grandes mères :** Mariam Samaké (paix à son ame) et Awa Karabenta

Merci pour votre amour, votre tendresse, votre soutien vos conseils et encouragement.

Trouvez en ce document le fruit de vos encouragements et de votre amour.

REMERCIEMENTS

Une thèse est le résultat d'un travail de longue haleine. Ce travail réalisé au laboratoire CICM (Centre d'Infectiologie Charles Merieux), n'aurait pu être réalisé sans un cadre de travail matériel et intellectuel favorable et sans soutien. Que soient donc ici remerciés tous ceux qui m'ont communiqués leurs savoirs, l'énergie et la confiance nécessaires au déroulement de cette étape scientifique particulière qu'est la thèse.

Principalement :

- **A tous mes maîtres** de l'enseignement primaire, secondaire et universitaire qui m'ont transmis leurs savoirs et leurs connaissances pendant mon parcours scolaire et universitaire.
- **A mes amis (es)** pour leur sympathie.
- **A mes nièces** en témoignage d'une longue vie.
- **A mes camarades de la FMPOS**
- **A mes voisins** pour leur relation de bon voisinage.
- **A tout le personnel du laboratoire Rodolphe Merieux** pour leur accueil, leur aide et leur sympathie qui ont été des atouts précieux tout au long de ce parcours.
- **A tout le personnel de la bibliothèque de la faculté de médecine** pour leur aide.
- **A nos aînés du service** pour leur disponibilité et leur conseil précieux.
- **A nos cadets du service** pour leur respect à mon égard.
- **A ceux de ma promotion au service** pour leur esprit d'équipe et leur sympathie.

Enfin, je reformule mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail elles sont si nombreuses pour que j'en fasse une liste nominative.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Flabou BOUGOUDOGO

**Maître de conférences agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de
Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,**

Directeur Général de l'Institut National de Recherche en Santé Publique,

**Responsable des cours de bactériologie et virologie à la Faculté de Médecine,
de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie,**

Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé.

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre simplicité et votre modestie font de vous un homme admirable. Votre disponibilité, votre rigueur dans le travail et vos qualités d'homme de science, de culture, de chercheur aguerri font de vous un exemple à suivre. Veuillez accepter cher maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

A notre Maître et Juge

Professeur Sounkalo Dao

- **Professeur titulaire de Maladies Infectieuses**
- **Chef de DER en médecine à la FMPOS**
- **Responsable de l'enseignement des Maladies infectieuses à la FMPOS**
- **Investigateur clinique au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose : SEREFO/FMOS/NIAD**
- **Président de la Société Malienne des Pathologies Infectieuses et Tropicales (SOMAPIT)**
- **Membre de la API (Société Africaine des Pathologies Infectieuses) et de la SPILF (Société des Pathologies Infectieuses en Langues Française).**

Cher maitre,

En acceptant d'apprécier ce modeste travail, vous contribuer à son indispensable amélioration. Votre grande disponibilité et votre rigueur ont été un soutien de taille pour mener à bien ce travail. Nous vous en serrons éternellement reconnaissant.

A notre Maître et Juge

Docteur Lassina Gadi Timbiné

- **Docteur en pharmacie**
- **Biologiste chercheur**
- **Directeur du laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux.**

Cher maitre,

Cher maitre, vous avez été d'un apport indispensable à ce travail par non seulement vos qualités scientifiques mais aussi par votre soutien et encouragement infaillible. Recevez ici cher maitre nos sincères remerciements et profondes gratitudees envers votre personne.

A notre Maître et Co-directeur de thèse

Docteur Bréhima GUINDO

- **Docteur en pharmacie**
- **Chef de service bactériologie-virologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP)**
- **Maître assistant de bactériologie-virologie à la FAPH**

Cher maitre,

Nous vous remercions infiniment d'avoir accepté de juger ce travail

Merci de nous avoir accordé une partie de votre temps et cela malgré vos multiples taches.

Nous vous seront reconnaissant et que DIEU vous le rende en bien.

A notre Maître et Directeur de thèse

Docteur Souleymane DIALLO

- **Maitre de conférences Agrégé d'immunologie,**
- **Maître de l'unité d'immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP,**
- **Directeur Scientifique du CICM de Bamako,**
- **Président de la Société Malienne d'Immunologie.**

Cher maître

C'est un privilège et un grand honneur que vous nous avez fait en nous confiant ce travail.

Au-delà de vos qualités de pédagogue reconnues par tous, nous avons découvert en vous un homme plein de générosité, de simplicité et rigoureux dans le travail.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections

Tableau II : séparation de certains membres des genres *Klebsiella* et *Raoutella*^{a,b}

Tableau III : fréquence d'isolement des Entérobactéries parmi les BGN

Tableau IV: fréquence de *Klebsiella pneumoniae* parmi les Entérobactéries isolés au LBM

Tableau V : distribution des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

Tableau VI : répartition des souches de *K. pneumoniae* parmi les prélèvements cliniques.

Tableau VII : distribution globale des souches de *K. pneumoniae* selon le sexe.

Tableau VIII : résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux différents antibiotiques testés

Tableau IX : répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Tableau X : répartition des principaux phénotypes selon la provenance de l'hôpital, le service et le type de malade.

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur un milieu chromogène non sélectif

Figure 2 : Automate VITEK® 2 Compact

Figure 3 : identification d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* avec la galerie API 20 E au LRM.

Figure 4 : image de synergie chez une souche de *K. pneumoniae*.

Figure 5 : répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* selon l'âge.

Figure 6 : taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines.

Figure 7 : taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux autres classes d'antibiotiques.

Figure 8 : représentation graphique des phénotypes de résistance de *K. pneumoniae* aux β -lactamines

SOMMAIRE

1.	
Introduction.....	19
Objectifs général	21
Objectifs spécifiques	21
2. Généralités sur les entérobactéries	22
2.1.1 Définition et classification	22
2.1.2 Habitat	23
2.1.3 Caractères bactériologiques	23
2.1.3.2 Caractères antigéniques	24
2.1.3.4 Pouvoir pathogène naturel	25
2.1.5 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques	25
2.1.5.1 Résistance aux bêta-lactamines.....	25
2.1.5.2 Résistance aux aminosides.....	29
2.1.5.3 Résistance aux quinolones	29
2.1.5.4 Résistance aux autres classes d'antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatifs	30
2.1.6 Conservation des souches	30
2.1.6.1 Principes généraux	30
2.1.6.2 Moyens de conservation	31
3.1 Dénomination :	32
3.1.2 Taxonomie	32
3.1.3 Classification :	32
3.2 Habitat et épidémiologie:	33
3.3 Caractères bactériologiques.....	33
3.3.1 Morphologie	33
3.3.1 Caractères cultureux	33
3.3.2 Caractères biochimiques.....	34
3.3.2.1 Caractères biochimiques de l'espèce-type de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
3.3.2.2 Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre <i>Klebsiella</i>	35
3.4 Caractères antigéniques.....	35
3.5 Pouvoir pathogène.....	36
3.5.1 Facteurs de pathogénicités.....	37
3.5.1.1 La capsule	37
3.5.1.2 Facteurs d'adhésion	37
3.5.2 Sidérophores	38
3.6 Rôle de <i>Klebsiella</i> et des <i>Enterobacteriaceae</i> dans les infections nosocomiales	38

3.7 Résistance aux antibiotiques	38
4. Matériels et Méthodes.....	39
4.1 Cadre de l'étude	39
4.2 Type d'étude.....	40
4.3 Période d'étude.....	40
4.4 Population d'étude.....	40
4.4.1 Critères d'inclusion.....	40
4.4.2 Critère de non inclusion.....	40
4.5 Echantillonnage.....	40
4.6 Collecte de données.....	40
4.7 Variables à traiter	40
5. Matériels	41
5.1 Souches étudiées	41
5.1.1 Matériels utilisés.....	41
5.1.2 Milieux de culture.....	41
5.1.2.1 Milieux de culture solides	41
5.1.2.2 Milieu de culture Liquide.....	41
5.2 Antibiotiques	41
5.3 Méthodes	42
5.3.1 Prélèvements.....	42
5.3.2 Culture	42
5.3.3 Isolement et purification des souches	42
5.3.4 Techniques utilisées pour l'identification des bactéries.....	42
5.3.4.1 Examen macroscopique	43
5.3.4.2 Examen microscopique	43
5.3.4.3 Identification biochimique	43
5.4 Test de sensibilité aux antibiotiques	44
5.4.1 Tests de détection des bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE).....	45
5.5 Analyses et Traitement des données	46
6. Résultats.....	47
6.1 Résultats globaux	47
6.1.1 Fréquence de <i>Klebsiella pneumoniae</i> parmi les Entérobactéries isolés au LBM.....	47
6.2 Résultats analytiques.....	48
6.2.1 Distribution des souches <i>K. pneumoniae</i> selon l'origine du prélèvement.....	48
6.2.2 Distribution des souches de <i>K. pneumoniae</i> selon les produits pathologiques	48
6.2.3 Distribution globale selon le sexe.....	49
6.2.4 Distribution selon l'âge	49

6.3 Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux différents antibiotiques testés.....	49
6.3.1 β -lactamines.....	50
6.3.2 Aminosides	51
6.3.3 Quinolones.....	51
6.3.4 Autres.....	51
6.4. Les phénotypes de résistance de <i>K.pneumoniae</i> aux antibiotiques.....	52
6.4.1 Phénotypes de résistance aux β -lactamines	52
7. Commentaires et Discussion.....	54
8. Conclusion et Recommandations.....	56
9. Références Bibliographiques	58
Annexe.....	61

1. Introduction

On parle de résistance aux antimicrobiens lorsque des micro-organismes (bactéries, champignons et parasites) et virus acquièrent une résistance à un médicament antimicrobien auquel ils étaient auparavant sensibles. La résistance aux antimicrobiens d'un large éventail d'agents infectieux est devenue extrêmement préoccupante pour les pays et de nombreux secteurs d'activité, représentant une menace croissante pour la santé publique. Il est particulièrement alarmant de constater la propagation rapide, dans le monde entier, de bactéries multi résistantes provoquant des infections courantes qui ne sont pas sensibles au traitement par les antimicrobiens existants (1).

Un premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques a dressé un tableau à ce jour de la résistance aux antibiotiques dans le monde, avec des données en provenance de 114 pays. Un plan d'action pour combattre la résistance aux antibiotiques a été mis en place et a été approuvé par l'Assemblée mondiale de la Santé en mai 2015 à Genève.

L'évolution rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène actuellement préoccupant à travers le monde particulièrement dans les pays en voie de développement où les pathogènes résistants aux antibiotiques peuvent avoir une plus forte prévalence dans certains pays et surtout en Afrique. En effet, ces dix dernières années ont été marquées par l'émergence et la dissémination de nouveaux gènes de résistance. Les défis majeurs de cette résistance ont été rencontrés principalement chez différentes espèces d'entérobactéries (1).

Les entérobactéries occupent une place importante en pathologie humaine et constituent plus de 80% des germes isolés au laboratoire de Biologie médicale. La fréquence, la gravité des infections communautaires ou nosocomiales dont ces bactéries peuvent être responsables (septicémies, infections nosocomiales, méningites...), traduisent des difficultés de prise en charge liées principalement à leur résistance aux antibiotiques

Parmi les entérobactéries les genres les plus fréquemment rencontrés en pathologies humaines sont entre autres *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Enterobacter* etc....

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères des infections urinaires (IU), des pneumonies et notamment des bactériémies (2). Elle est responsable de plus de 10% de toutes les infections bactériennes nosocomiales (3).

Selon le NHSN (National Healthcare Safety Network), *K. pneumoniae* est responsable de 7,9 % de l'ensemble des infections urinaires aux Etats-Unis, classée ainsi en cinquième position parmi tous les agents pathogènes incriminés. Cependant, en Tunisie, d'après le réseau de l'Anti bio-Résistance en Tunisie (LART), *K. pneumoniae* est essentiellement isolée d'infections urinaires en milieu hospitalier avec un taux de 60,4 % (4).

Klebsiella pneumoniae est largement distribuée dans l'environnement et est de plus en plus signalée comme une cause d'infections invasives dans les milieux hospitaliers, en particulier chez les patients immunodéprimés (5).

Klebsiella pneumoniae est omniprésente et possède deux habitats commun ; l'un est l'environnement, y compris les eaux de surface, les eaux usées, les sols et les plantes et l'autre les surfaces des muqueuses des mammifères.

C'est l'une des bactéries à Gram négatives les plus couramment rencontrées par les cliniciens du monde entier comme une cause d'infection chez l'homme et est responsable des épidémies en raison de la propagation de différents clones associés à des infections opportunistes chez les personnes atteintes de défenses immunitaires altérées, les diabétiques, les alcooliques et les patients hospitalisés avec moins de logement (2).

L'augmentation à l'échelle mondiale de la résistance médiée par les *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre élargi (BLSE) constitue une menace importante pour la santé publique, puisque des souches de *K. pneumoniae* BLSE+ résistantes à toutes les β -lactamines ont été isolées. D'après le Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) de France, en 2001.

Cette espèce bactérienne (*Klebsiella pneumoniae*) est distribuée dans tous les services hospitaliers surtout les unités de soins intensifs (USI), elle a la particularité d'acquérir des marqueurs de résistance, elle se trouve souvent la première entérobactérie engagée dans un mécanisme de résistance à une nouvelle molécule.

Koumba Diallo (49) dans une étude menée en 2010 à Bamako a constaté une évolution de la résistance de souches de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques, ainsi que l'absence d'épidémie à entérobactéries productrices de beta-lactamases à spectre élargi.

Au Mali il existe peu de données sont disponibles sur la résistance aux antibiotiques des bactéries du genre *Klebsiella*.

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre ce présent travail.

Objectifs général :

Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées au sein du Laboratoire Rodolphe Mérieux.

Objectifs spécifiques :

- Isolées les souches de *Klebsiella pneumoniae* dans différents prélèvements
- Tester la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées
- Evaluer le niveau de résistance aux différentes classes d'antibiotiques
- Déterminer leur fréquence d'isolement
- Déterminer les phénotypes résistants aux betalactamine

2. Généralités sur les entérobactéries

2.1.1 Définition et classification

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de leurs caractères bactériologiques communs.

- ce sont des bacilles à Gram négatif dont les dimensions varient de 1 à 6µm de long et 0,3 à 1µm de large.
- mobiles par une ciliature péritriche ou immobiles
- se développant en aéro-anaérobiose et sur gélose nutritive ordinaire.
- acidifiant le glucose par voie fermentative (à la différence des *Pseudomonas*) avec souvent production de gaz.
- ne possédant pas d'oxydase (à la différence de *Vibrio* et *Pasteurella*).
- réduisant les nitrates en nitrites.

Les Enterobacteriaceae ont un G+C% du DNA compris entre 38 et 60 mmol % (6).

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

- Certains genres sont anciennement décrits et les plus souvent rencontrés en pathologie ; ce sont :
Escherichia, Shigella.
Salmonella, Arizona, Citrobacter.
Proteus, Providencia, Morganella.
Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia
Yersinia, Edwardsiella.
- D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme ; ce sont : *Buttiauxella, Cedecea, Ewingella, Kluyvera, Koserella, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Obesumbacterium, Rahnella, Tatumella, Trabulsiella, Xenorhabdus, Yokenella* (7).

TABLEAU I : entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (8).

<i>Citrobacter freundii</i> ;	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Citrobacter (diversus) koseri</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> (groupe A)
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Shigella flexneri</i> (groupe B)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Morganella morganii</i> subsp.	<i>Shigella boydii</i> (groupe C)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>morganii</i>	<i>Shigella sonnei</i> (groupe D)
Groupe <i>Enterobacter</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
<i>agglomerans</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Proteus penneri</i>	€ subsp. <i>enterocolitica</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Enterobacter (cancerogenous) taylorae</i>	Salmonella, tous les sérotypes	
<i>Escherichia coli</i>		

2.1.2 Habitat

Le nom d'entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux.

La présence des entérobactéries dans le milieu extérieur résulte pour certaines espèces bactériennes de souillures fécales (importance en hygiène alimentaire) et pour d'autres de la pollution d'origine saprophyte.

On les rencontre donc abondamment dans le tube digestif, dans les cadavres d'animaux, les fumiers et les eaux d'égout. Elles peuvent aussi être trouvées dans le sol et beaucoup moins abondamment dans les poussières ou dans l'air, et par contamination, dans les eaux d'alimentation.

On peut aussi en retrouver à la surface des téguments et des muqueuses (9).

2.1.3 Caractères bactériologiques

2.1.3.1 Caractère culturaux

Les entérobactéries se développent bien dans un bouillon que sur une gélose ordinaire incubée 18 heures à 37°C.

- Les formes S (smooth) sont l'aspect habituel au sortie de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4mm de diamètre.

Le bouillon est trouble de façon homogène.

- les formes R (rough) s'observent surtout avec des souches ayant subi plusieurs repiquages.

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate.

En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- **les colonies muqueuses** sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces notamment *Salmonella Paratyphi B*.

- **les colonies naines** s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (6).

2.1.3.2 Caractères antigéniques

L'identification des *Enterobacteriaceae* se fait par l'étude des caractères biochimiques. La détermination du sérotype ne peut être entreprise que pour des souches dont l'identification est certaine. Toute autre façon de faire ne peut qu'entraîner des erreurs du fait d'agglutinations croisées non spécifiques.

- les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipo-polysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide.

Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

La spécificité O est perdue par les souches R qui sont auto-agglutinables en eau distillée.

- Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool.

Les réactions d'agglutinations se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

- Les antigènes K

Ces antigènes capsulaires sont généralement constitués d'une couche externe polysaccharidique. Parmi les antigènes K, se trouvent les antigènes L, A, B des *E. coli* et l'antigène Vi de certaines *Salmonella* ou *Citrobacter*. Ces antigènes peuvent rendre la souche qui les possède inagglutinable par les antisérums O. Ils sont détruits par une ébullition de deux heures.

Les antigènes d'adhérences ou adhésines, de nature protéique, en relation avec la présence de pili sont classés parmi les antigènes **K (K88, K99)**

- Antigène kunin

Cet antigène commun aux *Enterobacteriaceae* n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique (6).

2.1.3.4 Pouvoir pathogène naturel

Sur le plan de la pathologie humaine il convient de distinguer, comme avec les autres espèces bactériennes :

Les bactéries pathogènes spécifiques (BPS) que l'on ne retrouve pas à l'état commensal(en dehors des porteurs sains) et dont la présence dans les milieux extérieurs n'est qu'un phénomène transitoire.

Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les *Salmonella*, les *Shigella*, et les *Yersinia*.

Les bactéries pathogènes opportunistes (BPO).

Ces BPO peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente.

Les infections qu'elles peuvent engendrer ont pour origine :

Soit un point de départ endogène, ce qui s'explique par leur commensalité,

Soit un point de départ exogène. Il convient alors de distinguer deux aspects :

- l'un est rencontré dans l'hospitalisme infectieux où un défaut d'asepsie permettra la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade, par instrumentation ou par voie manu portée ;

- l'autre s'explique par le fait que ces bactéries de la flore digestive peuvent se retrouver, par élimination, dans la nature à l'état transitoire. Si elles n'engendrent généralement pas d'infections elles sont cependant le signe d'une contamination fécale, voire d'un défaut d'hygiène. Ce problème est d'une importance toute particulière puisque c'est principalement de la recherche d'espèces commensales telles que *Escherichia coli*, entérocoques et *Clostridium perfringens* et de leur absence que dépend la qualité sanitaire d'une eau ou d'un produit alimentaire (9).

Les entérobactéries peuvent représenter 80% des isolats cliniquement significatifs des bacilles gram négatifs et 50% des bactéries cliniquement significatives dans les laboratoires de microbiologie clinique. Ils représentent près de 50% des cas de septicémie, plus de 70% des infections urinaires et un pourcentage significatif d'infections intestinales (10).

2.1.5 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

La sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques est variable en fonction de l'espèce (résistance naturelle) et de la souche (résistance acquise).

La résistance peut toucher toutes les familles d'antibiotiques habituellement actives sur les entérobactéries. Elle résulte de quatre mécanismes : imperméabilité, efflux, modification de la cible de l'antibiotique (PLP), production d'enzyme (11).

2.1.5.1 Résistance aux bêta-lactamines

- Résistance naturelle ou phénotypes « sauvages »

Les entérobactéries produisent naturellement diverses bêta-lactamases ce qui permet de les classer en quatre groupes phénotypiques de résistance

Groupe 0 : phénotype « sensible » d'espèces dépourvues de gène de bêta-lactamase.

Salmonella spp et *P. mirabilis* sont dépourvus de bêta-lactamase à l'état « sauvages » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes.

Groupe 1 : phénotype « sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C

Comme les espèces précédentes. *E. coli* et *Shigella spp* sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxypénicillines, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC (groupe fonctionnel 1) qui peut entraîner, chez certaines souches, une réduction de sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux C1G.

La fréquence du phénotype « sauvage » chez *E. coli* est en moyenne de 50% en milieu hospitalier.

Groupe 2 : phénotype « pénicillinase de bas niveau »

Klebsiella pneumoniae, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter amalonaticus* et *Escherichia hermanni* produisent naturellement et de façon constitutive des enzymes chromosomiques de classe A sensibles aux inhibiteurs :

- SHV-1 (groupe fonctionnel 2b) ou LEN-1 (groupe 2a) pour *K. pneumoniae*,
- Les enzymes de type OXY (groupe 2be) pour *K. oxytoca*,
- Les enzymes CKO pour *C. koseri*,
- L'enzyme CdiA (groupe 2b) pour *C. amalonaticus*,
- L'enzyme HER-1 (groupe 2b) pour *E. hermanni*

Elles confèrent une résistance patente aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines et souvent inapparente aux uréïdopénicillines. Ce phénotype de résistance, appelé « pénicillinase de bas niveau », se caractérise par la persistance d'un diamètre d'inhibition autour des disques d'aminopénicillines (contrairement au phénotype « pénicillinase de haut niveau ou pénicillinase acquise » caractérisé par l'absence de diamètre d'inhibition autour de ces disques). Les associations pénicilline- inhibiteur sont actives.

Règles de lecture interprétative : La résistance aux pénicillines et tout particulièrement aux uréïdopénicillines, peut être de bas niveau. Tous les résultats « sensibles » doivent être interpréter « intermédiaires » pour ces molécules chez les espèces appartenant au groupe 2.

Groupe 3 : phénotype « céphalosporinase de bas niveau »

Les entérobactéries appartenant à ce groupe réunissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C (AmpC, groupe fonctionnel 1) chromosomiques et inductibles par les Bêta-lactamines (molécules fortement inductrices : céfoxitine, imipénème, clavulanate). Ces céphalosporinases sont très répandues chez les entérobactéries isolées en bactériologie clinique : *Enterobacter cloacae*,

Enterobacter aerogenes, *Serratia marcescens* (et les autres espèces de ce genre), *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* et *Pantoea agglomerans*.

Le phénotype « sauvage » de ces espèces, souvent appelé « céphalosporinase de bas niveau » comprend une résistance aux aminopénicillines, à leurs associations aux Bêta-lactamines inhibitrices et aux C1G. Le comportement vis-à-vis des C2G et des céphamycines permet de répartir les espèces en 3 sous-groupes : (i) les espèces sensibles au céfuroxime (C2G) et à la céfoxitine (céphamycine) : *H. alvei*, *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. agglomerans* ; (ii) les espèces plus résistantes à la céfoxitine qu'au céfuroxime : *E. cloacae*, *E. aerogenes* et *C. freundii* ; (iii) les espèces plus résistantes au céfuroxime qu'à la céfoxitine : *S. marcescens* et *M. morganii*.

La fréquence du phénotype « sauvage » est variable selon l'espèce et la situation épidémiologique du moment où du lieu considéré. Le phénotype sauvage est cependant plus fréquent chez les espèces *H. alvei*, *P. rettgeri*, *Providencia spp* et *M. morganii* (65 à 85%) que chez *C. freundii*, *E. cloacae* et *E. aerogenes* (38 à 65%).

Les espèces *Proteus vulgaris* et *Proteus penneri* appartenaient initialement à ce groupe. Pour des raisons phénotypiques et moléculaires, il est plus cohérent de les inclure dans un nouveau groupe 5 correspondant au phénotype « céfuroximase ».

Groupe 4 : phénotype Céphalosporinase *inductible*

Y. enterocolitica et *S. fonticola* produisent naturellement une céphalosporinase inductible de classe C (groupe fonctionnel 1) et une enzyme de classe A. Chez *Y. enterocolitica*, ce dernier est une pénicillinase constitutive de classe A produite à bas niveau (groupe fonctionnel 2b). Chez *S. fonticola*, l'enzyme de classe A est une bêta-lactamase inductible de la classe 2be (SFO-1 et apparentées).

Y. enterocolitica est résistante aux aminopénicillines, à leur association avec le clavulanate, aux carboxypénicillines et aux C1G. La résistance aux uréidopénicillines n'apparaît pas *in vitro*. Le phénotype de résistance de *S. fonticola* est similaire. Cependant, le céfuroxime n'est pas actif et la résistance à l'association aminopénicilline- bêta-lactamine inhibitrice, qui devrait normalement être induite par l'enzyme AmpC, ne s'exprime pas ou à très bas niveau *in vitro*

Groupe 5 : phénotype « céfuroximase »

P. vulgaris et *P. penneri* produisent naturellement une céphalosporinase de classe A inductible par les bêta-lactamines souvent appelée céfuroximase (groupe fonctionnel 2e). Le phénotype se caractérise par une résistance aux aminopénicillines, aux C1G, aux C2G (céfuroxime, céfamandole) à l'exception des céphamycines (céfoxitine) et une sensibilité aux associations pénicillines-bêta-lactamines inhibitrices.

Groupe 6 : phénotype « Bêta-lactamase à spectre étendu chromosomique »

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des bêta-lactamases à spectre étendu de classe A (groupe 2be). Ces BLSE souvent exprimées à bas niveau confèrent une

diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception de céphamycines. La résistance aux uréidopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensibles » en « intermédiaire » pour les pénicillines, de même pour les C3G si le test de synergie est positif (11).

- **Résistance acquise ou phénotypes « résistants »**

A la résistance naturelle aux bêta-lactamines peuvent s'ajouter un ou plusieurs mécanismes de résistance acquise. La résistance acquise par production de bêta-lactamase est le mécanisme prépondérant. Cependant, la fréquence des autres mécanismes de résistance, souvent exprimés à bas niveau, pourrait être sous-estimée faute d'études épidémiologiques.

Phénotype « pénicillinase de haut niveau » ou « pénicillinase acquise »

Le phénotype « pénicillinase de haut niveau » est d'expression variable selon la nature du promoteur du gène de structure, du nombre de copies du gène et de l'espèce bactérienne hôte. L'expression est souvent faible chez *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *M. morgani* et *Providencia*. Le phénotype de résistance se présente donc sous différentes formes qui évoluent entre deux extrêmes :

Une activité pénicillinase faible responsable d'une résistance limitée aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 2) et aux carboxypénicillines. La sensibilité aux uréidopénicillines et C1G apparaît peu ou pas affectée.

Une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs, aux carboxypénicillines, aux uréidopénicillines et aux C1G. Une diminution de la sensibilité est communément observée pour les associations ticarcilline-clavulanate et pipéracilline-tazobactam. La résistance peut s'étendre aux C2G, principalement chez *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp et *C. freundii*.

Règles d'interprétation : En raison des enzymes impliquées dans ce phénotype, il est recommandé d'interpréter les résultats « sensibles » en « intermédiaires » pour toutes les pénicillines si la production d'une pénicillinase est suspectée.

Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »

Le phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs » a été initialement décrit chez *E. coli* en 1991. Il comporte une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et à moindre niveau aux uréidopénicillines, comme dans le phénotype précédent. Cependant il s'en distingue par une résistance aux associations des aminopénicillines et des carboxypénicillines avec les bêta-lactamines inhibitrices alors que les C1G conservent généralement leur efficacité.

Phénotype « beta-lactamase à spectre étendu »

Le phénotype « beta-lactamase à spectre étendu » (BLSE) comprend une résistance aux pénicillines et aux céphalosporines, à l'exception des céphamycines. Cependant, la résistance aux C3G, C4G et à l'aztréonam est plus ou moins marquée selon les enzymes et les souches.

Phénotype « hyperOXY »

Des souches de *K. oxytoca* sont résistantes à haut niveau à l'ensemble des pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'exception des céphamycines, et à bas ou haut niveau à l'aztréonam. Le test de synergie avec le clavulanate est positif avec le céfotaxime, rarement positif avec les C4G et la ceftazidime. Le niveau de résistance, toujours plus élevé pour l'aztréonam que pour les C3G et les C4G, permet de différencier le phénotype « hyperoxy » du phénotype « BLSE »

Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »

Le phénotype « céphalosporinase de haut niveau » correspond à une résistance plus ou moins marquée aux pénicillines, aux C1G, aux C2G, à l'aztréonam et à au moins une C3G. Le test de synergie est négatif entre les C3G, les C4G ou l'aztréonam et les bêta-lactamines inhibitrices. Les céphamycines ne sont pas actives, exception faite vis-à-vis de l'espèce *H. alvei* et les C4G restent le plus souvent efficaces. La résistance aux C3G peut être totalement ou partiellement restaurée en présence de cloxacilline (100mg/l).

2.1.5.2 Résistance aux aminosides

Les différents genres composant la famille des entérobactéries sont naturellement sensibles aux aminosides à l'exception de *Providencia* et un grand nombre de *Serratia marcescens*.

L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de la résistance acquise le plus fréquent. Les enzymes sont codés par des germes plasmidiques qui peuvent atteindre tout ou partie des aminosides.

Le second mécanisme de la résistance acquise aux aminosides par imperméabilité cellulaire est moins souvent observé chez les entérobactéries. L'imperméabilité cellulaire entraîne le plus souvent une résistance croisée aux différents aminosides.

Le troisième aspect de la résistance acquise est l'altération de cible ribosomale par mutation chromosomique qui est encore plus rare chez les entérobactéries (11).

2.1.5.3 Résistance aux quinolones

Les entérobactéries sont sensibles aux quinolones classiques (acide nalidixique, acide pipemidique etc.) et aux fluoroquinolones (péfloxacin, ofloxacin etc.).

Néanmoins, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont plus ou moins bonnes selon l'espèce d'entérobactéries et les différentes quinolones.

La résistance acquise aux quinolones, dont le support génétique est exclusivement chromosomique (mutations), est due à deux mécanismes qui peuvent être associés : altération de la cible et/ou diminution de la perméabilité.

Il est important de constater que, dans la plupart des cas, la résistance à l'acide nalidixique s'accompagne d'une résistance aux autres quinolones.

2.1.5.4 Résistance aux autres classes d'antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram négatifs

Les entérobactéries habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines sont habituellement sensibles aux phénicoles, tétracyclines, sulfamides, triméthoprime, nitrofuranes, fosfomycine et polymyxine (colistine). Mais cependant la plupart des espèces de proteus, morganella, providencia et serratia sont résistantes aux tétracyclines, nitrofuranes et polymyxine. Enfin la rifampicine n'est active que sur certaines espèces d'entérobactéries. En plus de la résistance naturelle, les entérobactéries peuvent devenir résistantes (résistance acquise) à un ou plusieurs de ces antibiotiques ou antibactériens par mutations chromosomiques ou acquisition de plasmides de résistance (9).

Enfin un critère de gravité particulier est représenté par le fait que ces souches d'entérobactéries présentent souvent des résistances multiples aux antibiotiques. Un nombre croissant de souches, en particulier dans le genre Enterobacter, Serratia, Klebsiella et Providencia, quelques souches de Proteus indole-positif et des souches d'*Escherichia coli* cephalotine résistance, possèdent des bêta-lactamases qui augmentent le phénomène de résistance à de nombreux antibiotiques du groupe des bêta-lactamases. L'émergence et l'augmentation potentielle de souches d'entérobactéries productrices de BLSE (bêta-lactamases à spectre élargi) en particulier chez *K. pneumoniae* constituent un phénomène inquiétant. La détection de ces souches n'est pas seulement importante pour le patient mais également dans le cadre de la surveillance des infections nosocomiales (12).

2.1.6 Conservation des souches

Tout bactériologiste est confronté au problème de conservation des souches bactériennes particulièrement en Afrique où les conditions ne sont toujours pas réunies. Les motifs de conservation sont variés, parmi lesquels :

- Etude des gènes de résistance et de leur mécanisme ;
- Envoi de souches pour études plus approfondies (sérotypage, lysotypage, étude de virulence...) par un laboratoire de référence ;
- Etudes ultérieures de similitudes pour des souches isolées chez un même malade ou chez des malades différents (enquêtes épidémiologiques, mises en évidence d'infections nosocomiales...)
- Souches de référence utiles pour l'identification de souches inconnues, les études taxonomiques, l'enseignement ou la validation de techniques (antibiogramme, dosage de vitamines...). Ces souches proviennent généralement de centres spécialisés (collections) ;
- Souches à usage industriel : production de vaccins, d'antibiotiques, d'enzymes, de dérivés laitiers et agro-alimentaire (fermentations) ;
- Souches mutantes ayant des propriétés particulières.

2.1.6.1 Principes généraux

Si le but est de maintenir le plus longtemps possible sans repiquage, la vitalité d'une population bactérienne, il est également souhaitable que le phénotype et le génotype de la souche soient conservés.

Il convient dans tous les cas d'éviter :

- Tout stress pouvant entrainer la mort ou la dégénérescence des bactéries. Une température de conservation constante et la plus basse possible est donc recommandée, de même que le maintien à l'obscurité.
- L'apparition de mutants : des repiquages répétés, particulièrement en milieu liquide, sont déconseillés et tout repiquage se fera par prélèvement de colonies ;
- La perte de virulence : repiquages limités entre deux passages sur animal et dans certains cas, conservation des organes, voire de l'animal entier inoculé, par congélation.

La conservation de bactéries nécessite de les placer en état de vie ralentie ou momentanément suspendue (spores), donc dans des conditions peu favorables à leur multiplication. Les états secs ou congelés seront privilégiés et dans le cas de repiquages sur milieux de cultures, ceux-ci seront pauvres, exempts de sucres fermentescibles, à l'abri de l'action de l'oxygène de l'air (tube hermétique ou culture recouverte d'huile minérale).

D'une façon générale, la culture bactérienne sera en tout début de phase stationnaire afin de privilégier la conservation de cellules bactériennes matures, plus résistantes aux agressions liées aux diverses méthodes de conservation.

2.1.6.2 Moyens de conservation

- Conservation de courte durée (quelques jours à quelques semaines)

Au laboratoire : c'est dans ce délai qu'une conservation sur milieux de culture est envisageable sans être trop fastidieuse. L'intervalle entre deux repiquages sera fonction de la bactérie (variable selon le genre, l'espèce, voire au sein d'une même espèce), du milieu employé et des conditions ambiantes. Quelques règles générales : le milieu de culture choisi est incubé (18 à 24 heures à la température optimale de la souche), puis conservé à la température du laboratoire ou du réfrigérateur à 4°C. Les cultures seront conservées à l'obscurité, tubes hermétiquement bouchés, pour éviter la dessiccation et limiter l'action de l'oxygène de l'air. Dans ce dernier but, la culture incubée peut être recouverte d'huile minérale stérile ou scellée sous vide (bactéries anaérobies). Pour des bactéries peu fragiles (entérobactéries, staphylocoques, corynébactéries, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*...), il n'y a pas de problème particuliers de conservation pendant quelques semaines à 22°C.

Pour expédition : il existe dans le commerce des milieux de transports très utiles pour l'expédition de souches bactériennes y compris des bactéries très délicates mais dont il convient de s'assurer de la capacité à maintenir en survie la bactérie considérée. Pour des bactéries de culture difficile et nécessitant une atmosphère particulière (anaérobiose ou microaérophilie), on préférera l'expédition de la culture bactérienne dans des géloses profondes ou dans des sachets préservant cette atmosphère.

- Conservation de moyenne durée (quelques mois)

Les repiquages deviennent alors fastidieux et sont sources de mutations possibles. La multiplication cellulaire implique un métabolisme bactérien actif, ce qui augmente les risques de mutations ou d'altérations des caractéristiques (ferments). Les bactéries devront donc présenter un maximum de stabilité. On pourra cependant pour ce délai de conservation des milieux spéciaux adaptés ou la congélation à -80°C.

– **Conservation de longue durée (plusieurs années)**

Pour cette durée de conservation un maximum de garanties quant à la viabilité des échantillons sera recherché. Pour certaines bactéries, une simple dessiccation pourra suffire à maintenir un état de survie très long, mais pour la plus grande majorité des autres des méthodes plus sophistiquées comme la lyophilisation ou la congélation en azote liquide seront mises en œuvre (13).

3 LE GENRE KLEBSIELLA

3.1 Dénomination :

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs Edwin, 1877 et l'espèce type dénommée « pneumo bacille » par Friedlander qui l'a décrit comme agent des pneumonies mortelles pendant la période de 1882 à 1884 (14).

3.1.2 Taxonomie

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	<i>Klebsiella</i>

3.1.3 Classification :

On distingue plusieurs espèces :

Klebsiella pneumoniae (espèce type)

Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae

Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis

Klebsiella oxytoca

Klebsiella ornitholytica

Klebsiella planticola

Klebsiella terrigena. (15)

Klebsiella granulomatis

Klebsiella variicola

Klebsiella singaporensis

Dans le genre *Klebsiella*, un groupe de souches fixatrice d'azote isolées des plantes (banane, riz, canne à sucre et maïs) et des échantillons cliniques humains, principalement du sang, ont été nommés *K. variicola*.

Une deuxième nouvelle espèce, *K. singaporensis*, a été proposée pour une seule souche isolée du sol prélevée sur les racines de canne à sucre à Singapour (16).

3.2 Habitat et épidémiologie:

Les *Klebsiella* sont très répandus dans la nature. On les trouve dans l'eau, le sol et la poussière. Ce sont des bactéries commensales du tube digestif de l'homme et des animaux. Chez l'homme, on peut les retrouver dans l'oropharynx.

Le portage digestif de *Klebsiella* est plus important chez les malades hospitalisés que dans la population normale. Sur les mains du personnel et sur les objets de l'environnement dans les services hospitaliers, la présence de *Klebsiella* est très fréquente.

La transmission des *Klebsiella* d'un malade à un autre est habituellement manuelle.

Les épidémies hospitalières dues à des souches multi résistantes peuvent être observées (7).

3.3 Caractères bactériologiques

3.3.1 Morphologie

Les *Klebsiella* sont des gros bacilles à Gram négatif immobiles, entourés d'une capsule, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*.

Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont des bactéries Gram négatifs, des anaérobies facultatifs, en forme de bâtonnet ou coccobacille et leur taille varie de 0,3 à 1,0 µm de largeur et de 0,6 à 6,0 µm de longueur.

Les espèces du genre *Klebsiella* forment souvent des colonies mucoïdes (16).

3.3.1 Caractères cultureux

Sur milieux usuels, les *Klebsiella* donnent après une incubation de 24 heures à 37°C des colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses, ayant une tendance à la confluence.

Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse, est parfois observée avec d'autres *Enterobacteriaceae* notamment certaines souches de *E. coli* (6).

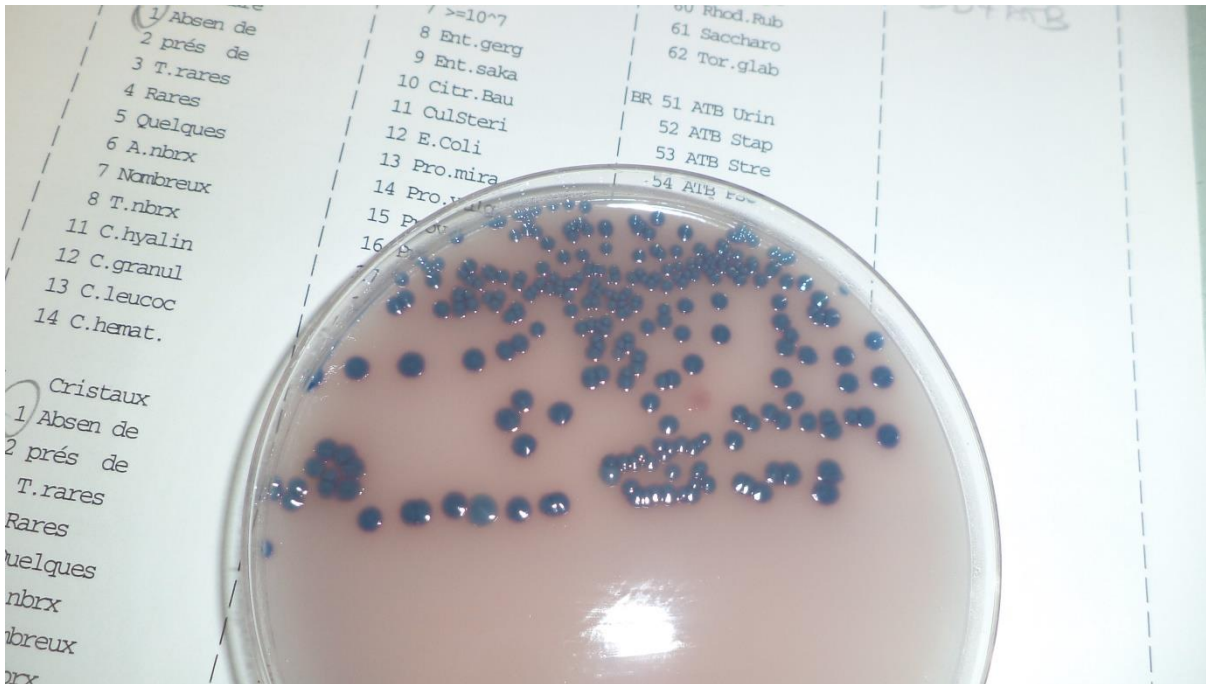


Figure 1 : aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur un milieu chromogène non sélectif au LRM.

3.3.2 Caractères biochimiques

3.3.2.1 Caractères biochimiques de l'espèce-type de *Klebsiella pneumoniae* :

- Fermentation des sucres : glucose+
- Métabolisme du tryptophane en indole : indole -
- ONPG +
- Production du gaz (+)
- Mobilité (-)
- VP (+)
- TDA (-)
- H₂S (-)
- ODC (-)
- ADH (-)
- LDC (+)
- Citrate de Simmons (+) (17)

- Urease (+)

3.3.2.2 Caractères biochimiques différentiels des espèces du genre *Klebsiella* :

Klebsiella oxytoca se distingue de *Klebsiella pneumoniae* par la production d'indole.

Klebsiella ozaenae est VP (-), ONPG (+) et malonate (-),

K. rhinoscleromatis est VP (-), ONPG (-) et LDC(-).

Tableau II: séparation de certains membres des genres *Klebsiella* et *Raoutella*^{a,b}. (16).

Espèces	Indole	ODC	VP	Malonate	ONPG	Growth at		Acid ^c from D- melezitose
						10°C	44°C	
<i>R. ornitholitica</i>	+	+	V	+	+	+	NA	NA
<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+	+	-	+	-
<i>K. ozaenae</i>	-	-	-	-	V	NA	NA	NA
<i>K. pneumoniae</i> ^d	-	-	+	+	+	-		-
<i>R. planticola</i>	V	-	+	+	+	+	-	-
<i>R. terrigena</i>	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>K. rhinoscleromatis</i>	-	-	-	+	-	NA	NA	NA

^a*K. singaporensis* biochimiques ne sont pas disponibles; Seule une seule souche est connue.

^bAbréviation et symboles : ODC, ornithine decarboxylase ; VP, Voges-Proskauer ; ONPG, o-nitrophenyl B-D- galactopyranoside ; NA, Not available; +, V, 11 à 89% ; -, < 10%

^d*K. variicola* est retiré de *K. pneumoniae* par la réaction négative d'adonitol ;

Certaines souches sont également négatives à L-Rhamnose.

3.4 Caractères antigéniques :

Les Klebsielles possèdent des antigènes O (somatiques) et K (capsulaires).

La recherche des antigènes présente peu d'intérêt pratique, en raison de leur nombre réduit (13 antigènes O différents) et de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires K.

La recherche des antigènes K est indispensable à toute enquête épidémiologique. Ils sont recherchés par agglutination sur lame ou en tubes, ou encore par la réaction de Neufeld dite du « gonflement » de la capsule (opacification de la capsule résultant d'une réaction antigène-anticorps). Le typage antigénique capsulaire peut aussi être effectué par immunofluorescence indirecte à pH9, par immunoélectrophorèse à contre-courant, par Co-agglutination de la souche de Cowan de *Staphylococcus aureus* enrobée d'anticorps anti capsulaire, par agglutination de particules de latex sensibilisées.

Il existe 77 types capsulaires, soit K1 à K72, K74, K79 à 82. *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca* se distribuent selon un grand nombre de type capsulaire.

Klebsiella ozaenae appartient généralement au type 4, plus rarement aux types 1, 5, 6, 22. *Klebsiella rhinosleromatis* uniquement au type 3.

Il existe des communautés antigéniques K entre *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* et d'autres entérobactéries quand elles sont capsulées (18).

3.5 Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est un agent classique et majeur d'infection nosocomiale en général et néonatale particulièrement (19).

Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires (IU) soit 6 à 17%.

Elle fait partie du groupe KES (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*) qui est d'une grande importance en clinique hospitalière (20).

Les espèces de *Klebsiella pneumoniae* sont à l'origine d'infection survenant dans les unités de soin intensif (USI).

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* est responsable d'infections bronchopulmonaires incluant les pneumonies lobaires nécrosante, les abcès pulmonaires et les pleurésies purulentes.

Elle est également responsable d'infections urinaires sur sonde, de bactériémies, de pneumonies, d'infections de sites opératoires et d'infections néonatales.

Chez l'homme cette espèce est isolée des selles chez 30% des individus et est isolée dans certaines circonstances pathologiques communautaires et nosocomiales (21).

Klebsiella pneumoniae subsp ozaenae : Provoque l'ozène, une rhinite atrophique primaire caractérisée par une inflammation chronique du nez.

K. pneumoniae subsp. ozaenae a été également isolée à partir de surinfections de bronchite chronique, de bactériémies, de méningites, d'abcès cérébraux d'otites, de mastoïdites, d'infections urinaires, de surinfections de plaies et d'ulcères de la cornée (22).

Klebsiella pneumoniae subsp rhinoscléromatis : provoque le rhinosclérome, une infection granulomateuse chronique des voies respiratoires supérieures (cavité nasale) (23).

Klebsiella planticola représenterait 8-19% des isolats cliniques de klebsiella associés à différentes situations cliniques dont les septicémies.

Cette espèce est responsable de la colonisation néonatale.

Klebsiella terrigena représenterait 0,4% des isolats cliniques et a été isolée à partir de prélèvements broncho-pulmonaires, de plaies et d'urines.
Sa signification pathologique reste à préciser.

Klebsiella granulomatis provoque la donovance ou granuloma inguinale.
Cette affection cosmopolite, le plus souvent vénérienne, a été décrite en Inde par McLeod en 1882 (21).

Klebsiella oxytoca : Ces Klebsiella sont une cause de méningites et d'abcès cérébral d'origine communautaire (24).

3.5.1 Facteurs de pathogénicités :

3.5.1.1 La capsule:

Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. C'est une véritable enveloppe de nature polysaccharidique présentant un antigène k (25).

3.5.1.2 Facteurs d'adhésion :

Différentes adhésines ont été mises en évidence chez *K. pneumoniae*. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la première étape du processus infectieux. Les propriétés d'adhésion des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili ou fimbriae. Ce sont des structures protéiques non flagellaires et filamenteuses formant des appendices à la surface des bactéries qui ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes. Ils sont formés de différentes sous unités.

Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

- Les fimbriae de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils ont la plus grande capacité d'adhésion. Ils sont impliqués dans la colonisation des tractus respiratoire et urinaire (26).

- Les propriétés des fimbriae de type 3 sont moins bien connues. Ils sont impliqués dans l'adhésion de *K. pneumoniae* à différents types cellulaires, par exemple aux épithéliums urinaire et respiratoire. Leur rôle comme facteur de virulence reste hypothétique dans plusieurs modèles d'infections (urinaire, pulmonaire). Néanmoins, du fait que ces structures semblent faciliter l'adhésion à des

supports inertes et avoir un rôle dans la formation de biofilm, elles pourraient participer à la physiopathologie des infections urinaires sur sonde (27).

3.5.2 Sidérophores

C'est la possibilité des bactéries à capter le fer environnant grâce à des structures particulières, les sidérophores. Dans l'organisme de l'hôte, le fer n'est pas à l'état libre mais associé à des glycoprotéines telles que la transferrine et la lactoferrine. En effet la captation du fer est essentielle à la croissance et à la réplication *in vivo* des bactéries et joue un rôle dans l'installation et la progression de l'infection (20).

3.6 Rôle de Klebsiella et des Enterobacteriaceae dans les infections nosocomiales

Les infections nosocomiales représentent un véritable problème de santé publique avec des conséquences considérables tant sur le plan individuel que sur le plan économique. Leur surveillance est devenue, au cours de ces dernières décennies, un élément essentiel de tout programme de lutte contre ces infections (28).

Elles constituent une situation préoccupante du faite de leur morbidité et mortalité élevées et surtout de l'émergence des souches multi résistantes (BMR) (29).

Les infections bactériennes constituent une part importante. Leur diffusion signe toujours une hygiène hospitalière insuffisante. Le manu portage par les personnels soignants, des infections urinaires sur sonde, des pneumopathies et les infections de site opératoire, le manque d'asepsie lors de gestes invasifs et une stérilisation insuffisante des matériels sont les déterminants majeurs des IN bactériennes, notamment multi résistantes.

L'infection urinaire occupe la troisième place des infections acquises en USI (17,6%) derrière les pneumopathies (46,9%) et les infections respiratoires basses (17,8%). D'après le National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS), 0,9% des infections nosocomiales sont en relation avec le décès du patient (30).

Les nouveau-nés sont soumis au risque nosocomial en maternité (3% d'infections), en néonatalogie (7,5 à 12,7%) et en réanimation (14,2%).

Dans 18 % des septicémies néonatales, les responsables sont des germes gram négatif : *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Escherichia coli*. Ces mêmes bacilles sont responsables de 55 % des pneumopathies (31).

Klebsiella pneumoniae a été associée à 2%-5% des infections nosocomiales, en particuliers celles impliquant les voies respiratoires et urinaires inférieures (32).

Klebsiella pneumoniae est l'un des agents pathogènes hospitaliers les plus importants, notamment en ce qui concerne la souche ESBL + souche multi drogue

Des études internationales de surveillance ont confirmé l'ampleur de la production des BLSE chez *K. pneumoniae*. En effet, la prévalence mondiale des *K. pneumoniae* BLSE, entre 2005 et 2007 est passée de 19,2 à 30 % selon le programme *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (SMART) (33).

3.7 Résistance aux antibiotiques :

Les Klebsielles ont une résistance naturelle à l'ampicilline et la carbenicilline. Elles sont normalement sensibles aux céphalosporines. Des mutants TEM et SHV1, décrits depuis la fin des années 1980, sont capables d'hydrolyser les céphalosporines à large spectre et les monobactames. Ces bêta-lactamases à spectre élargie (BLSE) sont particulièrement rencontrés chez *K. pneumoniae*.

Les céphamycines, le moxalactam et les carbapénèmes ne sont pas touchés. Ces nouvelles bêta-lactamases plasmidiques sont inhibées par l'acide clavulanique. Plus récemment ont été décrit des mutants résistants aux inhibiteurs de pénicillinases (TRI pour TEM résistant aux inhibiteurs).

La majorité des souches héberge des plasmides R qui les rendent résistantes à de nombreux antibiotiques. Le traitement ne peut se passer d'un antibiogramme sur lequel il est nécessaire de tester les antibiotiques les plus récents (6).

4. Matériels et Méthodes

4.1 Cadre de l'étude

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (C.I.C.M) a constitué notre cadre d'étude. Le C.I.C.M est situé dans le quartier de l'ex-base aérienne de Bamako, rue du Docteur Charles Mérieux.

Le CICM a été mis en place suite à la signature de l'accord-cadre N°0956/1899 du 18 février 2004 entre le Gouvernement de la République du Mali et la Fondation Mérieux ainsi que la Convention du 16 janvier 2005 et son protocole annexe du 11 mai 2011 entre le Ministère en charge de la Santé et la Fondation Mérieux.

- 8 Décembre 2003 : Création de la Fondation Mérieux Mali
- 15 Janvier 2004 : Pose de la première pierre du CICM
- 17 Janvier 2005 : Inauguration du CICM
- 2 Mai 2005 : Démarrage des activités

Le CICM comprend :

- Une administration générale.
- Un centre de formation avec une formation diplômante le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée) en cours pour un Master de Biologie Médicale appliquée, des formations qualifiantes et des formations par compagnonnage.
- Un laboratoire d'analyses médicales dénommé Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) avec des activités de recherche et des activités de routine.

La présente étude s'est déroulée dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Le CICM a pour mission de participer tout comme les autres structures du Ministère en charge de la Santé au développement sanitaire du Mali par le service rendu aux malades, la formation, la recherche et le renforcement des capacités dans le domaine du diagnostic biologique dans des conditions désintéressées au bénéfice de la population.

Les ressources humaines du CICM sont composées de 29 agents, répartis entre les services techniques du LRM (17 agents) et les fonctions de support administratif, financier et logistique (12 agents).

Le LRM se compose des Laboratoires 1 et 2 au sein desquels les activités de recherche et de diagnostic de routine sont effectuées. Le Laboratoire 1 offre le cadre et le matériel pour la réalisation des examens d'hématologie, de biochimie et d'immunologie et le Laboratoire 2 prend en charge les examens de microbiologie (bactériologie, mycologie et parasitologie).

4.2 Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétro-prospective portant sur les résultats bactériologiques enregistrés de 2016 à 2017.

4.3 Période d'étude

Notre travail a été une étude analytique rétrospective et prospective réalisée de Janvier 2017 à Septembre 2017, couvrant toutes les saisons y comprises : la saison froide, la saison sèche et la saison pluvieuse.

4.4 Population d'étude

La population d'étude était constituée des souches d'entérobactérie isolée au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017.

4.4.1 Critères d'inclusion :

Ont été inclus dans notre étude des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolée au Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) de Janvier 2016 à Septembre 2017 et ayant fait l'objet d'un antibiogramme quel que soit leur provenance et la nature des produits pathologiques.

4.4.2 Critère de non inclusion :

N'étaient pas inclus dans notre étude les souches de *Klebsiella pneumoniae* n'ayant pas fait l'objet d'un antibiogramme ou insuffisamment documentées et les souches isolées en dehors de la période de l'étude.

4.5 Echantillonnage

Nous avons choisi de mener ce travail de thèse sur *Klebsiella pneumoniae* à cause de sa fréquence dans les services et des épidémies causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques.

Durant la période de notre thèse, 68 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées à partir des prélèvements pathologiques (Urine, Pus d'abcès, Sang et Expectoration).

4.6 Collecte de données

Les données ont été collectées à partir des fiches d'antibiogramme dont le questionnaire comportait outre le numéro d'identification, les souches isolées, la nature des prélèvements, l'âge des patients, leurs sexes, la structure de santé ainsi que les antibiotiques testés.

4.7 Variables à traiter

Les variables étudiées étaient :

- L'âge,

- le sexe,
- le type de prélèvement,
- le type de germe (genres, espèces)
- la période (saison fraîche, saison sèche, saison pluvieuse)
- le profil de résistance aux antibiotiques testés

5. Matériels

5.1 Souches étudiées

Dans notre travail nous avons étudiés 68 souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées à partir des prélèvements pathologiques des services du C.I.C.M.

5.1.1 Matériels utilisés

- Microscope optique ;
- Bec benzène ;
- Pipettes pasteur;
- Anse de platine ;
- Boîtes de pétri;
- Lames et lamelles ;
- Etuve;
- Automate (mini API - VITEK 2 Compact)
- Distributeurs d'antibiotiques;
- Ecouvillon.

5.1.2 Milieux de culture

5.1.2.1 Milieux de culture solides

- Gélose URI SELECT4
- Milieu Drigalski
- Milieu Hecktoen
- Mueller Hinton

5.1.2.2 Milieu de culture Liquide

- Bouillon (cœur-cervelle)

5.2 Antibiotiques

- β -lactamines

Amoxicilline (AMX) 25µg, Amoxicilline-acide-clavulanique (AMC) 20/10µg, Tazobactam-piperacilline (TZP) 75/10µg, Céfalotine (CFT) 30µg, Céfoxitine (CEF) 30µg, Céfotaxime (CAZ) 30µg, Céfotaxime (CTX) 30 µg, Imipinèm (IMI) 10µg, Ticarcilline (TIC) 75µg.

- Aminosides

Amikacine (AKN) 30µg, Gentamicine (GEN) 15 µg, Tobramicine (TOB) 10µg.

- Quinolones

Acide nalidixique (NAL) 30µg, Norfloxacin (NOR) 5µg, Ciprofloxacine (CIP) 5µg.

- Autres

Fosfomycine (FOS) 50µg, Sulfaméthoxazole–Triméthoprim (SXT) 25µg, Nitrofurantoine (NITRO) 300µg.

5.3 Méthodes

5.3.1 Prélèvements

Les prélèvements étaient fonctions des sites d'infections et étaient constitués d'urines, de pus, d'expectorations et d'hémocultures, reçus en routine au LRM du CICM.

5.3.2 Culture

On a procédé directement à une recherche de germes et cela en déchargeant en stries condensées l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée.

5.3.3 Isolement et purification des souches

Après une lecture morphologique, les différentes colonies obtenues sont ré-isolées sur un nouveau milieu stérile afin d'obtenir des souches pures.

5.3.4 Techniques utilisées pour l'identification des bactéries

L'identification des souches a porté sur une série de tests préliminaires (examen macroscopique des colonies), tests biochimiques (Api 20E, Vitek 2 compact).



Figure 2 : Automate VITEK® 2 Compact. (Photo prise au LRM le 10/02/2017)

L'automate VITEK® 2 Compact de bio Mérieux est utilisé pour l'identification des bactéries et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques.

5.3.4.1 Examen macroscopique

L'aspect des colonies sur le milieu solide permet une orientation par la couleur, la taille, la forme et la fermentation du lactose.

5.3.4.2 Examen microscopique

• Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie et permet de rechercher l'affinité tinctoriale des bactéries leurs morphologies et leurs modes de regroupement. Elle permet une classification des bactéries selon leur structure

5.3.4.3 Identification biochimique

L'identification biochimique a été réalisée à partir de la galerie API20E. API20E est utilisé pour l'identification des entérobactéries et autres bacilles Gram négatif non fastidieux. La galerie API20E comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubés pendant 24h dans une étuve à 37°C en aérobiose.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou après ajout des réactifs de révélation.



Figure 3 : image d'identification d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* avec la galerie API 20 E au LRM.

5.4 Test de sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est l'interprétation de la sensibilité des bactéries à l'antibiotique en termes d'efficacité Clinique. Il permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante).

La technique utilisée est la méthode de diffusion sur disques sur gélose Mueller-Hinton et interprété après mesure des diamètres d'inhibition en accord avec les recommandations du comité d'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM version 2017).

Pour le control de qualité, nous avons utilisés la souche de référence *E.coli* ATCC 25922

5.4.1 Tests de détection des bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)

Au cour de l'antibiogramme, la production de BLSE a été mise en évidence par la recherche d'une synergie d'action entre l'association amoxicilline-acide-clavulanique, les céphalosporines de troisième génération (CTX, CAZ) et ATM selon les techniques suivantes:

□ Principe

Le test de synergie permet la détection de BLSE chez une souche donnée. L'action de ces enzymes peut être mise en évidence par la méthode de diffusion sur disques, qui consiste à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines de troisième génération. Cette image se manifeste par une image dite "bouchon de champagne".

□ Technique

La recherche de BLSE est fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, puis en disposant les disques d'ATB: un disque d'AMC et les disques de C3G (CTX, CAZ) et l'ATM à une distance de 20 à 30 mm sur les boites de Pétri. Incubation pendant 24 heures à 37°C.

□ Lecture

La production des enzymes BLSE se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques d'AMC et les C3G.

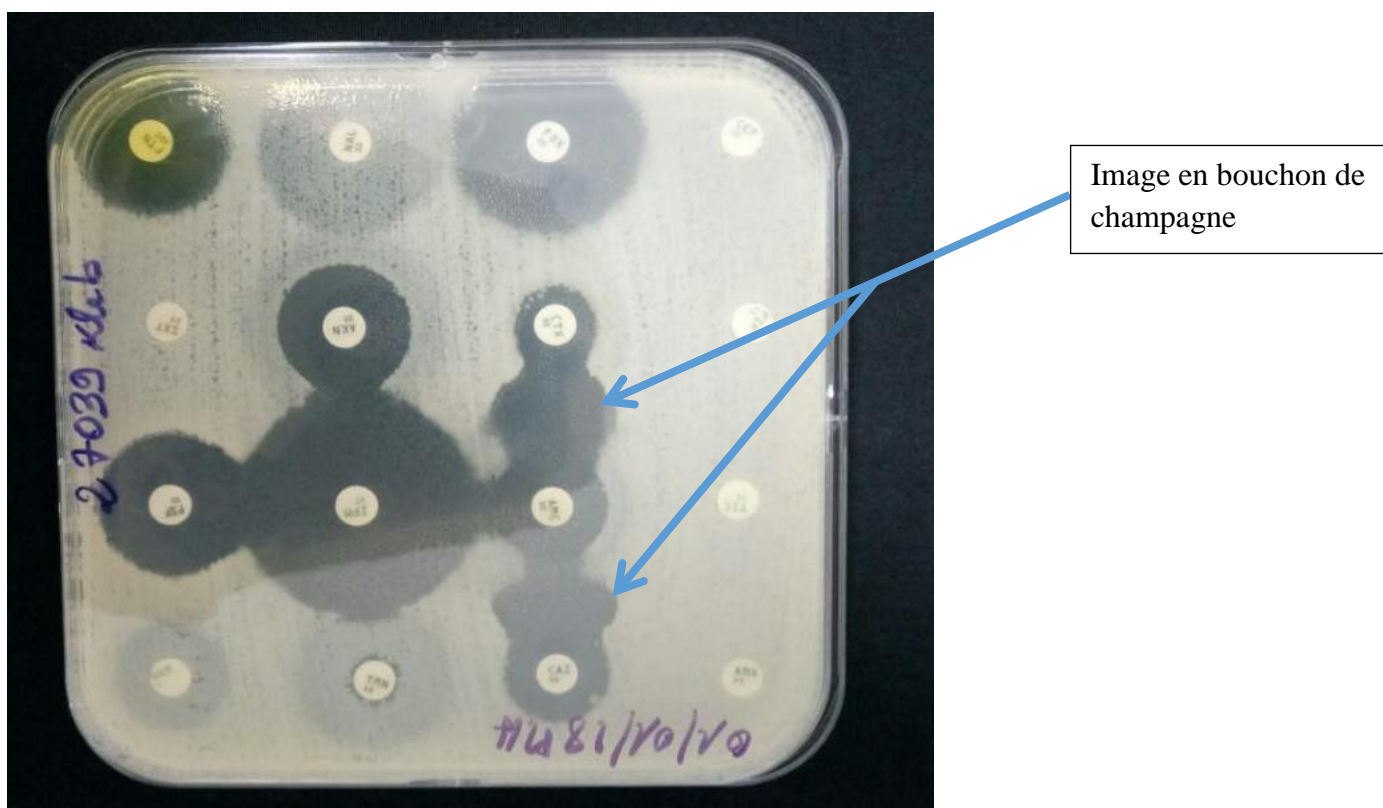


Figure 4 : image de synergie chez une souche de *K. pneumoniae* dite en bouchon de champagne.

5.5 Analyses et Traitement des données

Nous avons saisi et analysé nos données sur le logiciel Epi info 7.2.1.0. Les figures ont été élaborées à l'aide du logiciel EXCEL.

5.6 Aspect éthique

Les données ont été recueillies sur des fiches d'antibiogramme comportant le nom des patients, l'âge et leur sexe. Les résultats de ce travail ne seront utilisés qu'à des fins scientifiques pour l'amélioration de la prise en charge des patients.

5.7 Diagramme de Gantt

périodes / activités	Novembre- Décembre 2016	Décembre- Janvier 2017	Janvier- Décembre 2017	Janvier- Mai 2018	Mai- Juin 2018	Juin 2018
Revue de la littérature	✓					
Elaboration et correction du protocole		✓				
Collecte et analyses des données et rédaction de la thèse			✓			
Correction du document					✓	
Soutenance						✓

6. Résultats

6.1 Résultats globaux

Au LRM 402 bactéries à gram négatifs ont été isolés au cours de notre période d'études allant de janvier 2016 à septembre 2017 dont 370 Entérobactéries et 32 Autres (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Bordetella* et *Burkholderia*)

Tableau III : fréquence d'isolement des Entérobacteries parmi les BGN

BGN	Effectifs	Pourcentage
Entérobactéries	370	92,04
Autres	32	7,96
Total	402	100

La majorité de nos isolats étaient constitués d'entérobactérie (92,04%).

6.1.1 Fréquence de *Klebsiella pneumoniae* parmi les Entérobactéries isolés au LBM

Tableau IV: fréquence de *Klebsiella pneumoniae* parmi les Entérobactéries isolés au LBM

Germes spécifiques	Effectifs	Pourcentage
<i>E.coli</i>	197	53,24
<i>Klebssiella pnneumoniae</i>	68	18,38
<i>Salmonella</i>	39	10,54
<i>Proteus</i>	27	7,30
<i>Enterobacter</i>	16	4,32
<i>Serratia</i>	3	0,81
<i>Citrobacter</i>	2	0,54
<i>Providencia</i>	2	0,54
<i>Morganella</i>	9	2,43
<i>Raoultella ornitholytica</i>	4	1,08
<i>Shigella</i>	3	0,81
Total	370	100

Klebsiella pneumoniae occupe la 2ème position dans notre étude avec une fréquence de 18,38% après *E.coli* (54,24%).

6.2 Résultats analytiques

6.2.1 Distribution des souches *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement

Tableau V: distribution des souches de *K. pneumoniae* selon l'origine du prélèvement.

Origine	Effectif	Pourcentage(%)
Souche communautaire	44	64,71
Souche hospitalière	24	35,29
Total	68	100

Durant notre étude 68 souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été colligés.

Les résultats illustrés ci-dessous montrent une prédominance des souches communautaires par rapport aux souches hospitalières. Dans notre étude *Klebsiella.pneumoniae* est plus isolé en communauté qu'à l'hôpital 64,71% contre 35,29%.

6.2.2 Distribution des souches de *K. pneumoniae* selon les produits pathologiques

Tableau VI : répartition des souches de *K. pneumoniae* selon le type de prélèvement.

Prélèvement	Nombre de <i>K. pneumoniae</i>	Pourcentage(%)
Urine	38	55,88
Pus	23	33,82
Sang	6	8,82
Expectoration	1	1,47
Total	68	100

Parmi les 68 souches de *K. pneumoniae* étudiés dans différents produits pathologiques, 35,29%

proviennent des prélèvements de pus et autres, 55,88% ont été diagnostiquées dans les urines, et 8,82% dans le sang.

Donc l'espèce *K. pneumoniae* est isolée essentiellement à partir des urines soit 55,88% des cas, elle est suivie par les prélèvements de pus avec 25% des cas.

6.2.3 Distribution globale selon le sexe

Tableau VII : distribution globale des souches de *K. pneumoniae* selon le sexe.

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Homme	42	61,76
Femme	26	38,24
Total	68	100

Les sujets de sexe masculin étaient plus touchés par les infections à *Klebsiella pneumoniae* que ceux du sexe opposé (61,76%).

Le sexe ratio est en faveur du sexe masculin soit 1,61.

6.2.4 Distribution selon l'âge

La tranche d'âge de 25 à 65 ans était la plus représentée à 45,57% suivie de la tranche 0 à 25 ans à 27,93% et 26,46% pour les patients âgés de 65 ans à plus.

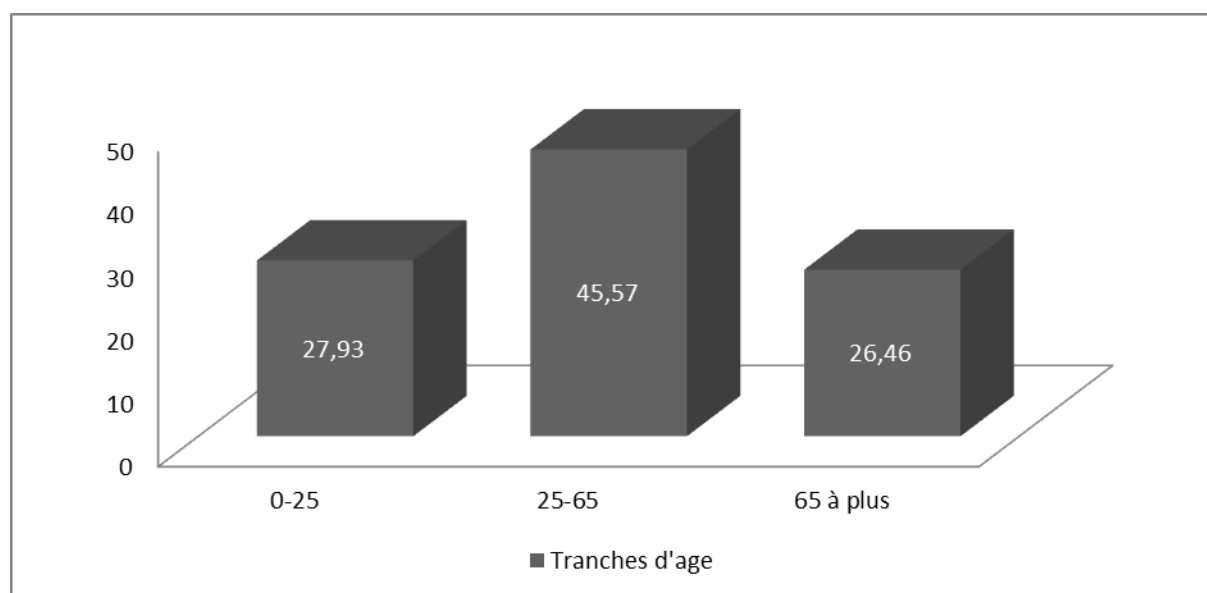


Figure 5 : répartition des souches de *K. pneumoniae* selon l'âge.

6.3 Résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux différents antibiotiques testés

Toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été testées vis-à-vis des 18 molécules d'antibiotiques appartenant à des familles différentes dont les β -lactamines, les aminosides, les quinolones et autres antibiotiques.

Tableau VIII : résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux différents antibiotiques testés

Antibiotique	Sensibilité	Résistance	Effectifs
β-lactamines			
Amoxicilline	0(0%)	68(100%)	68
Amoxi-Acide-Clavulanique	22(32,35%)	46(67,65%)	68
Ticarcilline	0(0%)	68(100%)	68
Tazobactam-Piperacilline	17(48,57%)	18(51,43%)	35
Céfalotine	22(32,35%)	46(67,65%)	68
Céfoxitine	60(88,24%)	8(11,76%)	68
Céftazidime	27(39,71%)	41(60,29%)	68
Céfotaxime	30(48,39%)	32(51,61%)	62
Imipenème	67(98,53%)	1(1,47%)	68
Aminoside			
Gentamicine	38(62,30%)	23(37,70%)	61
Amikacine	46(87,04%)	8(12,96%)	54
Tobramicine	28(49,12%)	29(50,88%)	57
Quinolones			
Acide-Nalixidique	27(40,30%)	40(59,70%)	67
Norfloxacin	15(46,88%)	17(53,13%)	32
Ciprofloxacine	26(60,47%)	17(39,53%)	43
Autres			
Sulfaméthoxazol-Triméthoprim	20(39,22%)	31(60,47%)	51
Fosfomycine	15(93,75%)	1(6,25%)	16
Nitrofurantoïne	6(60%)	4(40%)	10

Outre la résistance naturelle aux antibiotiques, *K. pneumoniae* a développé de forte résistance aux beta-lactamines et aux quinolones par contre les autres classes ont montré des résistances relativement faibles.

6.3.1 β-lactamines

Les β-lactamines sont les antibiotiques de premier choix pour le traitement des infections à *K.pneumoniae*

A partir des résultats obtenus, toutes les souches étudiées sont résistantes à l'amoxicilline et la ticarcilline avec un taux de résistance de 100%(résistance naturelle). L'association amoxicilline-acide clavulanique présente un taux de résistance de 67,65%. Concernant la céftazidime et le céfotaxime présentent des taux de résistance respectivement de 60,29% et de 51,61%. Mais l'imipenème et la céfoxitine présentent une bonne activité sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* avec un taux de sensibilité de 98,53% et 88,24%.

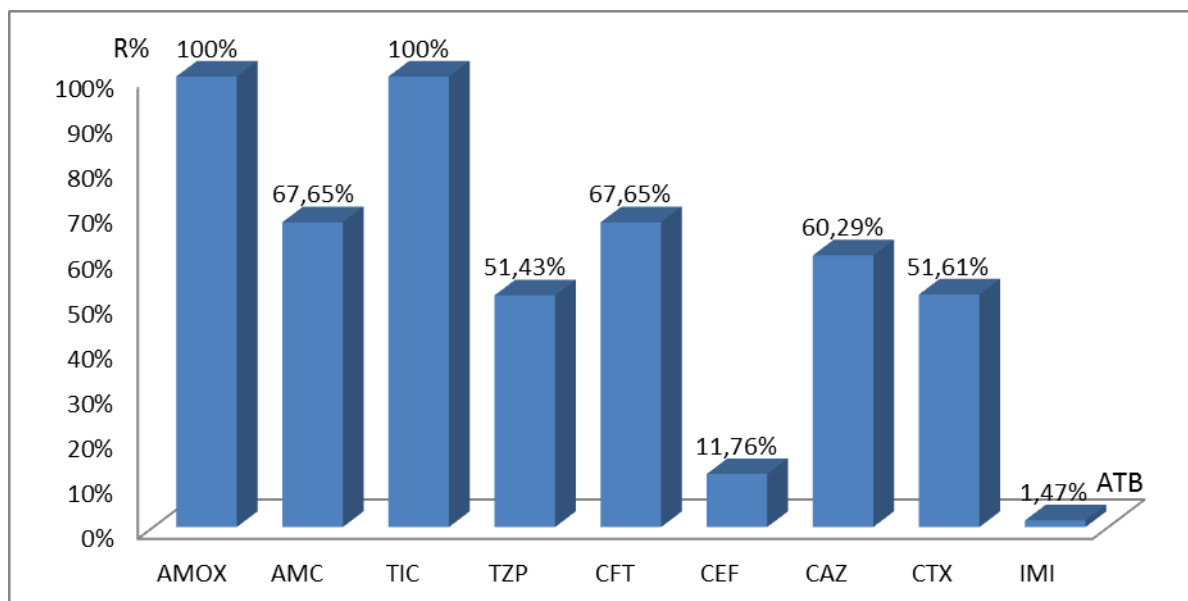


Figure 6 : taux de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β -lactamines.

6.3.2 Aminosides

Pour les aminosides un taux de résistance a été observé pour la gentamycine de 37,70%, de 50,88% pour la tobramicine, mais beaucoup faible pour l'amikacine de 12,96%, donc une excellente activité de 87,04% est enregistrée pour ce dernier.

6.3.3 Quinolones

En ce qui concerne les quinolones, les souches de *K. pneumoniae* présentent des taux de résistances respectivement de 59,70% pour l'acide nalixidique, de 53,13% pour la norfloxacin et de 39,53% à la ciprofloxacine.

6.3.4 Autres

Un taux de résistance de 60,78% est observé pour l'association sulfamethaxazole+triméthoprim (cotri), suivi par un taux de résistance plus faible de 40% pour le Nitrofurantoine. Mais la Fosfomycine présente une bonne sensibilité avec un taux de 93,75% sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

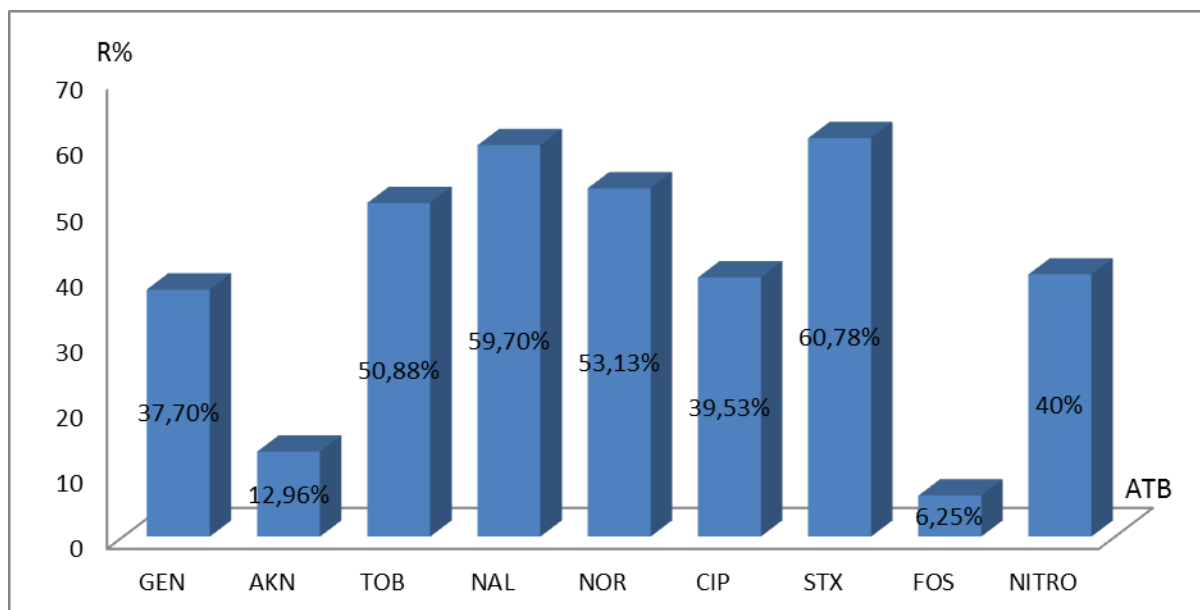


Figure 7 : taux de résistance de *K.pneumoniae* aux d'autres classes d'antibiotiques.

6.4. Les phénotypes de résistance de *K.pneumoniae* aux antibiotiques

Afin d'obtenir une meilleure interprétation des résistances bactériennes vis-à-vis des molécules testées, les résultats de l'antibiogramme sont traduits en phénotypes de résistance.

6.4.1 Phénotypes de résistance aux β -lactamines

Les phénotypes de résistance vis-à-vis des β -lactamines sont illustrés dans le tableau 6.

Tableau IX : répartition des principaux phénotypes de résistance aux β -lactamines.

Phénotype de Résistance	Effectifs	Fréquence%
BLSE	38	55,88
PBN	21	30,88
PHN	9	13,24
Carbapénèmase	0	0

Quatre phénotypes de résistance aux β -lactamines, dont 21 sauvages est représentés dans notre étude avec 30,88%.

Les BLSE dominant dans 55,88% des cas, suivi par des PHN dans 13,24% des cas, mais le type carbapénèmase n'a pas été observé.

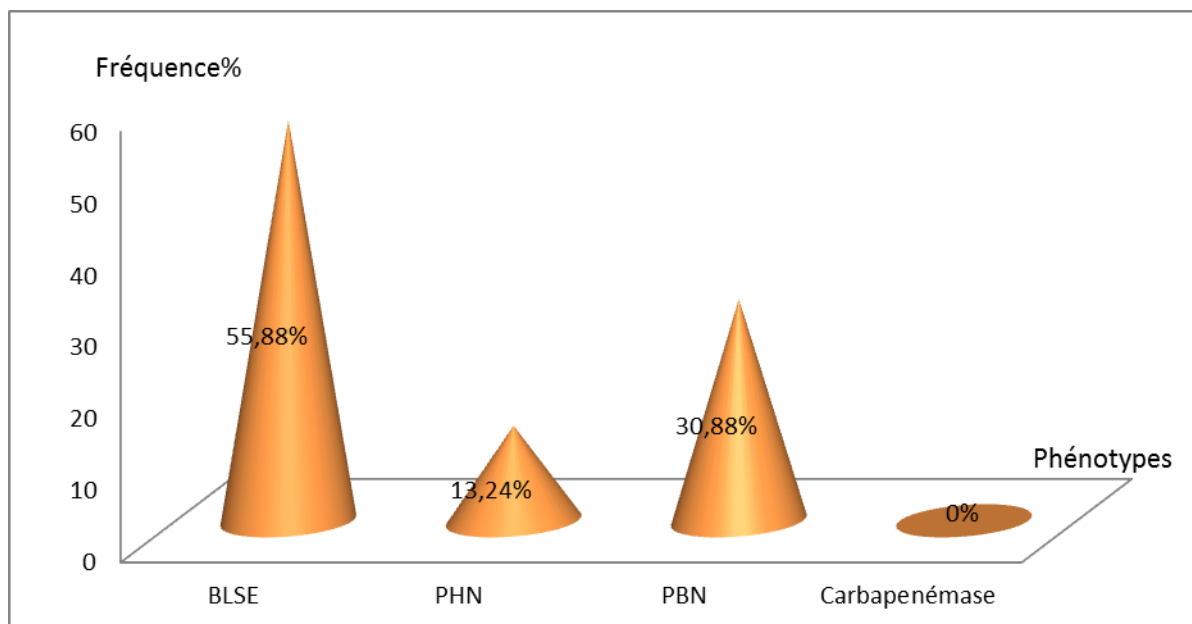


Figure 8 : représentation graphique des phénotypes de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux β-lactamines.

Tableau X : répartition des phénotypes selon la provenance de l'hôpital, le service et le type de malade

Phénotype	Hôpital (PG, Gabriel Touré et Hôpital du Mali)	Service	Type de Malade
BLSE	14	ND	ND
PHN	3	ND	ND
PBN	7	ND	ND

Concernant la provenance des souches hospitalière, nous remarquons que 24 phénotypes de résistance de *Klebsiella pneumoniae* ont été colligés dont 14 BLSE, 3 PHN et 7 PBN.

Le service et le type de malade était non déterminés.

7. Commentaires et Discussion

Durant les dernières décennies, *Klebsiella pneumoniae* est devenue une importante cause d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. Des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques (34).

Le taux d'isolement des souches de *Klebsiella pneumoniae* dans notre étude est de (16,91%) 68 souches parmi un total de 402 bacilles à Gram négatif.

Cette valeur est inférieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U de Gabriel Touré (20,09%) 86 souches parmi un total de 428 bacilles à Gram négatif (35).

Elle occupe la 2ème position dans notre étude avec une fréquence de 18,38% après *E.coli* (54,24%). Cette fréquence est supérieure à celle de Sira Alice DIOMAN au niveau du CHU du point G avec 17,8% en 2008 (36).

Les résultats de notre étude montrent que la fréquence de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* à l'association amoxicilline-acide clavulanique était de l'ordre de 67,65 % ce qui est comparable aux résultats obtenu par Tony Jonan au Laboratoire Rodolphe Mérieux en 2014 (37).

Un taux de résistance inférieure avec 60% a été retrouvé dans une étude Algérienne en 2016 (38).

Les premières observations de BLSE sont décrites en Europe et, rapidement après, aux États-Unis à partir de 1988 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle β -lactamase à transmission plasmidique chez une *Klebsiella pneumoniae* (39).

Dans cette étude, Le taux de résistance à la ceftazidime était de 60,29% ce qui ne concorde pas aux résultats obtenu par Tony Jonan avec 70% de résistance (37).

Dans notre étude la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération (C3G) d'utilisation courante comme le céfotaxime est de 51,61%, un taux inférieur avec 48,8% a été retrouvé dans une étude Marocaine en 2010 (40).

Les résultats de notre étude montrent que 55,88% des souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées sont productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Ceci montre une probable augmentation du taux de BLSE au Mali en 2008, Maimouna Kanté a eu un taux de BLSE de 27% chez les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolée en routine(41) ; une étude réalisée par Diakaria Konaté au niveau du Laboratoire Rodolphe Merieux avait obtenu un taux plus élevé des souches de *K. pneumoniae* productrice de BLSE avec 56,4% (42).

Ce taux est supérieur des données nationales marocaines rapportées par le Réseau de Surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques (RSRBA) de 2007 qui rapportait 40,2% de *K. pneu* BLSE+.

Nos résultats sont également très supérieur de ceux retrouvés en côte d'ivoire, en Algérie et au niveau du C.H.U du Point G avec 26%, 41% et 43,4% respectivement (43–45).

Une étude menée au Togo en 2010, dans un hôpital universitaire au Sénégal et au Maroc montrent que 30,1%, 31,7% et 37,60% des souches de *Klebsiella pneumoniae* étaient productrices d'une BLSE (40,46,47).

Les carbapénèmes représentent la dernière ligne de défense dans l'armement antimicrobien contre les infections à germe résistants (34).

Une bonne activité de L'imipénème a été remarquée dans notre étude avec seulement une résistance de 1,47%. Ce résultat est très éloigné de celui de HASSAINE Samiya en Algérie avec un taux de résistance de 4.76% en 2013 (48).

Concernant les aminosides, on assiste à l'émergence d'une résistance importante pour la tobramicine avec 50,88% et une résistance de plus en plus croissante marquée pour la gentamicine avec 37,70%, cette valeur est supérieure à celle retrouvée au niveau du C.H.U du GABRIEL TOURE (33%) en 2010 (49).

En revanche l'amikacine reste relativement plus efficace avec un taux de résistance plus bas, touchant 12,96% des souches, cette fréquence est supérieure à celle de TOUTOU SISSOKO au niveau du CHU du PG (5,6%) en 2006 (35).

Dans notre étude, la prévalence globale des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux quinolones et fluoroquinolones a atteint des chiffres inquiétants avec 59,70% à l'acide nalidixique, 53,13% à la norfloxacin et 39,53% à la ciprofloxacine

Nos résultats se rapprochent de celle d'une étude menée au CHU de Rabat qui montrait des taux élevés de résistance de 53,85% à l'acide nalidixique, 52,38% à la norfloxacin et un taux plus élevé de 49,94% à la ciprofloxacine en 2016 (50).

Ces niveaux de résistance obtenus sont inquiétants et alarmants. Cette situation est la conséquence de la pression de sélection due à la prescription massive et l'usage souvent abusif des fluoroquinolones pour traiter les infections à entérobactéries.

Pour l'association sulfaméthazole+triméthoprim (Bactrim), les souches de *K. pneumoniae* présentent un taux de résistance de 60,78% , ce qui s'éloigne du taux obtenu par SEBAIS SAFA avec 50% de résistance (38).

Une excellente activité est enregistrée pour la fosfomycine qui marque 6,25% de souches résistantes. Un taux beaucoup plus important a été retrouvé dans une étude Algérienne avec 25% de résistance (44) .

8. Conclusion et Recommandations

Le pourcentage d'isolement de l'espèce à partir des prélèvements urinaires est plus important soit 55,88% de l'effectif.

Cette étude nous montre que, un grand nombre de nos souches de *Klebsiella pneumoniae* ont présenté un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les β -lactamines, les aminosides, et les quinolones.

Par ailleurs l'imipénème, la cefoxitine et la fosfomycine restent les molécules les plus actives.

Ce constat alarmant impose aux cliniciens une prescription rationnelle des antibiotiques afin de minimiser la pression sélective exercée par une antibiothérapie à large spectre, souvent abusive et inadéquate.

En définitive, une politique de surveillance régulière de la résistance doit être mise en place dans tous les centres de santé afin de limiter l'émergence des BMR au Mali.

RECOMMANDATIONS

❖ **Au Ministère de la santé :**

- Sensibiliser la population de l'émergence d'un péril sanitaire qui découle de l'usage excessif des antibiotiques et de la diffusion épidémique de souches des EBLSE et de leurs gènes de résistance, par suite d'un respect insuffisant des règles d'hygiène de base;
- Suivre régulièrement la production de Bêta-lactamase chez les Enterobacteriaceae au Mali;
- Mettre en place un mécanisme de surveillance de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques;
- ❖ Mettre en œuvre des moyens suffisants permettant la surveillance épidémiologique de la résistance aux antibiotiques des souches bactériennes isolées au laboratoire.

❖ **Aux prescripteurs :**

- Eviter la prescription systématique des céphalosporines de troisième génération qui favorise la sélection de mutants résistants;
- Demander dans la mesure du possible un antibiogramme avant d'envisager une antibiothérapie

❖ **A la population :**

- Suivre scrupuleusement les prescriptions médicales surtout s'il s'agit des agents antibiotiques;
- Eviter l'automédication.

❖ **Au C.I.C.M :**

- Continuer cette étude en augmentant la taille de l'échantillon et en incorporant des souches de contrôle ;
- Maintenir cette capacité de surveillance des pathogènes multi-résistants aux antibiotiques;
- Elaborer une stratégie de suivi des patients

9. Références Bibliographiques

1. Patricia A. Bradford. Extended-Spectrum beta-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Résistant Threat. Clin Microbiol Rev. 2001;14(4):933-51.
2. Mereym Berrazg, Seydina M. Dienne, Mourad Drissi, Marie Kempf, Hervé Richet, Luce Landraud, et al. Biotyping of Mullidrug Resistan *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDITOF MS. avr 2013;8.
3. Stenn G. Stahlhut, Carsten Struve, Karen A. Krogfelt, Andreas Resneir. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requiers either type 1 or type 3 fimbriae. 23 April 2012. 14 oct 2011;351.
4. Nedjai S, Baguigua A, Djahmi N, jamali L, Zerouali K. Prevalance and characterization of exteaded specrum-lactamase in *Klebsiella- Enterobacter-Seratia* group bacteria? in algeria. Medecine et maladies infectieuses 42. 2012. 2011;20-9.
5. Wenzhi BI, Haiyang Liu, Rhys A. Dunstan, Bin Li, Von Vergel L T, Jianming Cao, et al. Extensively Drug-Resisitant *Klebsiella pneumoniae* Causing Nososcomial Bloodstream Infections in China: Informing Therapy, and clinical Outcomes. 30 juin 2017;2.
6. Avril J-L, H. D, F. D, H. M. BACTERIOLOGIE CLINIQUE. 3 ellipses. Paris cedex 15; 2000. 171-173-210 p.
7. Fauchère J. L, Avril J. L. Bactériologie générale et médicale. 15^e éd. 2002. 252-365 p.
8. Freney J, Girardo P, Freydière AM, Renaud FNR. Enterobacteries. 2008. 90-5-135 p.
9. Ferron A. Bactériologie médicale. 15 eme C et R. 157-163 p.
10. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae : introduction and identification Dans Manual of clinical microbiology. Patrick R. Murray. 9^{ème}. 2007. 649-66 p.
11. Bonnet R. Beta-lactamine et Enterobacterie Dans: Antibiogramme. 3 eme ESKA. Pais; 2012. 165-88 p.
12. Freney J, Croze M. Enterobacteriaceea-généralité Dans: Précis de bactériologie clinique. 2 eme Eska. Paris; 2007. 979-87 p.
13. Bimet F. Conservation des bactéeies In: Précis de bactériologie clinique. 2 ed ESKA. Paris; 2007. 729-33 p.
14. DUCA E, DUCA M, FURTUNESCU G. Microbiologie médicale. Didactique et pédagogique. Bucarest. 2^e éd. 1979. 436 p.
15. Gorge M Garrity, Julia A Bell, Timoty G Lilburn. Taxonomic outline of the Procaryote. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. second. 2004.

16. Sharon L L, Abbott. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and Other Enterobacteriaceae. Dans: manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 9^e éd. Vol. 1. 2007. 698-706 p.
17. Joly B, Reynaud A. Enterobacterie. Systematique et méthode de diagnostic. 2002. 79 80 83.
18. Richard CL, Grimont F. *Klebsiella, Enterobacter, Hafinia, Serratia*. In: LE MINOR(L). Bactériologie médicale. Flammarion. Paris; 1992. 427-31 p.
19. Boukadida J, Salem N, Hannachi N, Monastiri K, Snonssi N. Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de beta-lactamase à spectre étendu. 2002;463-8.
20. R. Podschun, U. Ullmann. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. oct 1998;4(11):589-98.
21. Michel Drancourt. *KLEBSIELLA* in: Précis de Bactériologie Clinique. Editions ESKA. 2000. 1172 p.
22. MICHEAL J S, PAUL E S, BURKE A C. Cerebral Abscess caused by *Klebsiella ozaenae*. 1987;25(8):1553-4.
23. Botelho-Nevers E, Gouriet F, Lipidi H, Couvret A, Amphoux B, Dessi P, et al. Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases: International Journal of infectious diseases.
24. Janda, J.M., Abbott, S.L. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria. 2nd ed. Washington; 2006. 115-119 p.
25. Hennequin C, Forestier C. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamase encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. Research in Microbiology 158. 2007. 339-347 p.
26. Carsten Struve, Martin Bojer, Karen Angeliki Krogfelt. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae by Detection of Phase Variation during Colonization and Infection and Impact and Virulence. sept 2008;76(9):4055-65.
27. Tricia A. Schurtz S, Timo K. Korhonen, Douglas B. Hornhick, Steven Clegg. Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* Strains. juin 1998;66(6):2887-994.
28. K. El Rhazi, S. Elfahir, M. Berraho, N. Tachfouti, Z. Serhier. Prévalence et facteurs des infections nosocomiales au CHU Hassan II de Fès (Maroc). 2007;13(1):57.
29. L Fortes Déguénonvo, K T, NM Dia B, R Ka, Y Cissoko, A Diouf, et al. Résultats d'une enquête d'incidence des cas d'infections nosocomiales à bactéries multirésistantes dans un centre hospitalier à Dakar (Sénégal). 1 Sept au 31 décembre 20;9.
30. Martine BUTREAU-LEMAIRE, Henry BOTTO. Infection urinaire nosocomiales. 1997;7:674_682.
31. E. Lachassinne, E. Letamendia R, J. Gaudelus. Epidemiology of nosocomial infections in néonates. 2003;11:229-33.

32. Angel Asensio, Antonio Oliver, Paulino Gonzalez D, Fernando Baquero, Jose Claudio Pérez D, Purification Ros, et al. Outbreak of a Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* Strain in an Intensive Care Unit: Antibiotic Use as Risk Factor for Colonization and Infection. 1 janv 2000;30:55-60.
33. Dalète Elhani, Laila Bakir, Mahjoub Aouni. Changement de l'épidémiologie de *Klebsiella pneumoniae* productrices de beta-lactamases à spectre élargi. oct 2011;69(5):524.
34. N Arafa, F Smati, J M Scheftel, O Meunier. Caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *Klebsiella pneumoniae* subsp *pneumoniae* isolées à l'hôpital universitaire de constatine, Algerie. 25 nov 2009;(30):43-9.
35. Mme Moustapha Sissoko toutou. Infections urinaires a bamako: aspects épidémiologiques, bactériologique et cliniques. [Bamako]: Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2005.
36. Sira Alice Dioman. Épidémiologie des entérobactéries productrices de beta-lactamase a spectre élargi au CHU DU POINT G. [Bamako]: Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2008.
37. Tony Jonan Zardelon Zitti. Mise en place de la surveillance des résistances aux antibiotiques des germes responsables d'infections urinaires dans le LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX DE BAMAKO. Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2014.
38. Boughachiche Roumeissa Sebais Safa. Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des *klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine. [Algerie]: Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie; 2016.
39. Tlamçani Z, Ellaia K, Benomer A, Kabbaj H, Alaoui AE. La résistance aux fluoroquinolones chez des souches de *Klebsiella* spp productrice de beta-lactamase à spectre étendu isolée dans les urines. 2009;67(5):553-6.
40. Ndog Batjeck Roland. Prévalence et antibioresistance de *Klebsiella pneumoniae* à beta-lactamase à spectre étendu Et son impact visàvis d'autres Familles d'antibiotiques. Faculté de Medecine de Pharmacie - RABAT; 2010.
41. Kanté Maimouna. Prévalences des enterobacteries productrices de BLSE au niveau du C.H.U Gabriel Touré. Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2005.
42. Diakaria Konate. Contribution à l'étude de la résistance des Enterobacteriaceae aux antibiotiques par production de beta-lactamases aux Centre Charles Merieux de Bamako. Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2010.
43. Joel Eric Tahou, Nathalie Kouadio Guessennd, Paulin Diddier Sakouri, Valérie Gbonon. Antimicrobial Resistance Of *Klebsiella pneumoniae*-ESBL Producing Strains Isolate From Clinical Specimens in Abidjab (Cote d'Ivoire). 08/ Juin/2017. 1 juill 2017;
44. Solyaman Ajdakar. Les enterobacteries productrices de beta-lactamase à spectre élargie (BLSE): profil épidémiologiques actuel et conséquences thérapeutiques. Faculté de Medecine de Pharmacie MARRAKECH; 2015.

45. Tenoussé SAYE. Prévalence des entérobactéries productrices de beta-lactamases a spectre élargi au CHU DU PG DE 2006 A 2008. Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2011.
46. Akouétévi Gérard TOUDJI, Bouaima DJERI, Simplicite Damintoti Karou, Ségla Tigossou. Prévalence des souches d'entérobactéries productrices de betalactamases à spectre élargi isolées au Togo et leur sensibilités aux antibiotiques. juin 2017;
47. Camara M, Diop-Ndiaye H, BA-Diallo A, KARAM F. Épidémiologies des souches de *klebsiella pneumoniae* a spectre élargie dans un hôpital universitaires au senegale,2011. déc 2013;1(2):34.
48. Hassaine Samiya. Etude de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques au niveau du CHU de Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen; 2012.
49. Koné Koumba Diallo. Fréquence d'isolement des klebsiella au laboratoire de bactériologie CVD DU CHU GABRIEL TOURE DE 2002 A 2017. [PG]: Faculté de Medecine de Pharmacie et OdontoStomatologie; 2009.
50. Amal Ben Moussa. Profil de sensibilité des entérobactéries aux fluoroquinolones aux CHU de RABAT. Faculté de Medecine de Pharmacie - RABAT; 2016.

10. ANNEXES

Annexe 1 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

Rédigé le:	21/02/2005	Par : AlHadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	22/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	23/02/2005	Par : Fatou Faye TRAORE	FFT	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	LD	Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	25/04/2016	Par :		Version N° 4
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO: Mode opératoire du prélèvement cyto bactériologique des urines Réf. M07 ANA BAC-029

Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1

Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1

Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2

Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1

Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07 ANA BAC- 025 V2

Mode opératoire de la technique de coloration de Gram Réf. M07 ANA BAC-

0022 V2

Mode opératoire d'utilisation de la cellule Kova Réf. M07 ANA BAC- 001 V1

Mode opératoire d'utilisation du microscope Réf. M04 MAT

D :

E :

I – Buts

Décrire le mode de l'examen cyto bactériologique des urines.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECBU : Examen Cyto bactériologique des Urines

BK : Bacille de Koch

E. coli : Escherichia coli

Na Cl : Chlorure de potassium

ATB : Antibiogramme

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

. Principe

L'examen cytot bactériologique des urines permet de rechercher une infection urinaire et d'identifier le(s) microorganisme(s) en cause.

2. Matériel

- Bocal (aérobie et anaérobie) ;
- Automate (mini API - VITEK 2 Compact) ;
- Densitomètre ;
- Vortex ;
- Cassette VITEK 2.

3. Consommables

- Oese ;
- Cartes VITEK 2 Compact ;
- Cellule de numération (Kova® slide) ;
- Bandelette (3 paramètres) ;
- Tube conique (10 à 20 ml) ;
- Tube sec.

4. Milieu de culture

- Gélose URI SELECT4

5. Etape pré analytique

5.1. Nature du prélèvement

Le prélèvement urinaire doit être collecté dans **un flacon stérile**, et acheminé immédiatement au laboratoire pour traitement.

Le recueil des urines est une étape essentielle qui conditionne pour une grande part la qualité et l'interprétation de l'examen Cf. **Mode opératoire du prélèvement cytot bactériologique des urines**. Réf. **M07 ANA BAC- 029 V2**

6. Analytique

Récupérer la fiche de paillasse destinée à L'ECBU contenant, toutes les informations concernant le patient (en faisant le numéro 66 sur le CODAT informatique) puis procéder aux différentes étapes qui suivent.

6.1. Examen macroscopique

Elle consiste à noter l'aspect et la couleur des urines. Une urine normale est de couleur jaune et d'aspect limpide.

Aspect : limpide, légèrement trouble, trouble, hémorragique,

Couleur : jaune, jaune pâle, jaune dore, jaune foncé, jaune claire, ambrée.

6.2. Mise en culture

Ensemencer systématiquement pour éviter toute contamination des urines :

- Homogénéiser le prélèvement par agitation ;
- Porter le numéro d'identification du patient sur la gélose Uri select 4 devant recevoir l'ensemencement ;
- Ensemencer sur une gélose Uri select 4 qui permet la numération et l'identification des principaux germes urinaires ;
- L'ensemencement proprement dit est réalisé à l'aide d'une oese stérile calibrée à 10 μ l :
 - o Immerger l'oese dans l'urine en la tenant verticalement ;
 - o Décharger le contenu de cette oese en appuyant la boucle sur le haut de la gélose Uri select 4 ;
 - o Tirer de ce point une verticale jusqu'au 1/3 de la boîte;
 - o Sans recharger l'oese, faire des stries perpendiculaires serrées en partant du point de dépôt jusqu'à la fin ;
 - o Si la technique est correctement réalisée et si le dépôt n'est pas trop important, après incubation, la boîte doit présenter des colonies isolées.
- Mettre la gélose **Uri select 4** dans un bocal (aérobie) et laisser incuber à 37°C pendant 24h.

6.3.L'examenmicroscopique

- Comptage des éléments

Après agitation délicate (pour avoir des urines homogènes), mettre 10 μ l d'urine dans la cellule de Kova, laisser reposer quelques minutes et lire au microscope à l'objectif x10 et x40 puis noter les différents éléments rencontrés dans les urines à savoir : les leucocytes, les hématies, les cellules épithéliales, les cristaux, les cylindres, les œufs de Schistosomes, le Trichomonas ...

- Les images de quelques éléments rencontrés dans les urines :
- Préparation du culot urinaire
 - o Homogénéiser l'urine ;

- o Remplir les 3/4 d'un tube conique à centrifuger ;
- o Centrifuger 5 minutes à 35 00 tours/minute ;
- o Rejeter le surnageant dans le lavabo, en retournant le tube conique ;
- o Remettre en suspension le culot en aspirant et refoulant doucement trois fois avec une pipette ;
- o Etaler le culot sur une lame portant le numéro d'identification du patient pour la coloration de Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram.**
- o En suivant les règles d'utilisation du microscope, observer le frottis à l'immersion
(objectif ×100).

Dosages de protéines et du glucose

Elle consiste à la recherche de la présence de protéine et de glucose dans les urines à l'aide d'une

bandelette adaptée :

- Ne pas toucher les zones réactives de la bandelette,
- La plonger dans l'urine et la retirer immédiatement en éliminant l'excès d'urine en tapotant légèrement la tranche de la bandelette sur le bord du récipient.
- La tenir horizontale pour éviter toute interférence avec les réactifs des plages voisines.
- Lire à l'œil par comparaison à l'échelle colorimétrique.
- Si la lecture de la bandelette se révèle positive pour la recherche de protéine ou/et de glucose, prendre un tube conique et transvaser une partie des urines du flacon à centrifuger à 3500 tours pendant 5 minutes.
- Prendre un tube sec (tube à hémolyse) sur lequel on inscrira le numéro d'identification du patient, et y recueillir le surnageant qu'on enverra sur la paillasse de biochimie pour le dosage des protéines et/ou glucose.

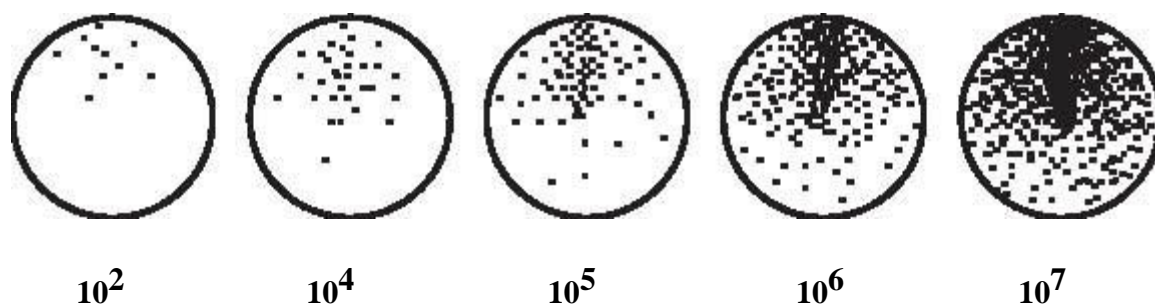
N.B : Si l'urine est hémorragique il n'est pas nécessaire de faire l'étude chimique. Faire une recherche

des cristaux et des parasites (schistosome) à partir du culot urinaire entre lame et lamelle.

6.4. Lecture et interprétation

- Numération

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la densité des colonies présentes sur la moitié supérieure de la gélose **URISELECT 4** sera comparée à celle du schéma suivant :



Une numération $\leq 10^4$ germes/ml correspond le plus souvent à une contamination. Toutefois, un tel résultat doit être interprété en fonction de la leucocyturie et du contexte clinique. Une numération $\geq 10^5$ germes/ml correspond probablement à une infection, à condition que le prélèvement ait été correctement réalisé.

Leucocyturie (leuco/ml)	Bactériurie (bact/ml)	Interprétation
<10/mm ³	<10 ²	Urine normale, non infectée
>10/mm ³	>10 ²	Infection urinaire, habituellement mono microbienne, et poly microbienne chez un porteur d'une sonde à demeure
< 10/mm ³	>10 ²	Discordance entre absence de réaction cellulaire et bactériurie: infection débutante, contamination, infection sur terrain particulier
< 10/mm ³	10 ² à 10 ⁵	Contamination, prélèvement incorrecte. Un nouveau prélèvement est nécessaire
>10/mm ³	< 10 ²	Leucocyturie sans germe. Infection à BK, infection traitée par antibiotique, ou cause non bactérienne

.Tableau : Numération et interprétation des colonies sur la gélose URISELECT 4.

Identification

Etablir le diagnostic en fonction de la couleur des colonies :

Coloration rose : il y a présomption d'*E. coli* à confirmer par le test urée / indole car toutes les colonies de coloration rose ne sont pas forcément des *E. coli*. On effectuera l'identification par le Vitek 2 Compact si Indole négative car *E. coli* est **Indole positive**.

Un faible pourcentage de souches d'autres bactéries possèdent une activité β galactosidase et peuvent apparaître de couleur rose sur ce milieu : il s'agit de souches rarement isolées au cours

des infections urinaires (*Salmonella*, *Shigella*, *Streptocoque A*) ou de souches pouvant être rencontrées dans ce type d'infections mais étant indole négative (*Citrobacter*, *Hafnia*, staphylocoques, *Streptocoque B*).

Un très faible pourcentage des souches d'*E. Coli* présente un profil indole négative.

Coloration incolore :

Bacille à Gram négatif : faire une oxydase **Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase**

o **Si l'oxydase est positive**, il y a forte présomption de bactéries non fermentaires

(*Pseudomonas*, *Bulkholderia...*);

o **Si l'oxydase est négative**, cas des bactéries fermentaires(Entérobactéries).

Dans les deux cas faire une identification et l'antibiogramme par Vitek 2 Compact.

Pseudomonas aeruginosa... **Cf. Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07 ANA BAC- 025 V2**

6.5. Résultat

Préalablement noté sur la fiche de paillasse édité, celui-ci doit être saisi dans le système informatique du laboratoire.

Si possible, communiquer le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste est à mesure de téléphoner ou ses assistants.

6.6. Validation technique/ Critères de repasse

La validation de l'antibiogramme effectuée par la galerie Mini Api doit être faite par le technicien. Si le milieu est limpide, le germe est non résistant (sensible) à l'antibiotique existant dans ce puit, dans le cas ou le milieu est trouble, le germe est résistant à l'antibiotique.

Le technicien doit vérifier que le résultat de l'automate est conforme à celle qu'il observe sur la galerie, dans le cas contraire rectifier les résultats de l'automate.

6.7. Hygiène et sécurité

Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de Javel à 10%.

- Faire toujours les manipulations en présence d'une flamme ;
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées et si possible un masque de protection ;
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants ;
- Ne jamais manger, ni boire lors des manipulations en laboratoire.
- Bien conserver à +2 - 8°C, à l'abri de la lumière les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminations ;
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme ;

- Eviter de déposer les bouteilles au bord des paillasse ;
- Se laver les mains bien et régulièrement à l'eau de Javel et au savon anti-bactéricide.

7. Post analytique

7.1. Validation biologique

Réservée au biologiste, elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur. Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

7.2. Rendu des résultats

Après la validation biologique les résultats sont enregistrés par le technicien ou la secrétaire dans le registre de la section bactériologie/parasitologie et rendu sous pli fermé au médecin ou au malade.

7.3. Gestion des déchets

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à 12° chlorométrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1**

7.4.. Archivage des données

L'enregistrement, les cahiers de paillasse et les registres de laboratoire sont conservés au laboratoire. Le système informatique du laboratoire permet d'archiver tous les dossiers des patients.

Annexe 2 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

Rédigé le:	21/02/2013	Par : Doussou COULIBALY	DC	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	25/04/2016	Par :		Version N° 1
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P: Procédure de gestion des déchets

MO: Mode opératoire de la coloration de Gram

Mode opératoire d'utilisation du VITEK 2

COMPACT Mode opératoire d'utilisation du mini

Api

D

:

E

:

I – Buts

Décrire le mode de l'examen bactériologique des pus et abcès.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen Cytobactériologique

ATB : Antibiogramme

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

1. Principe

Il s'agit d'identifier des germes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

2. Matériel

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes
- Pipettes pasteur,
- Jarre (aérobie et anaérobie),
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automate (mini Api - VITEK 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 Compact.

3. Consommables

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,
- Tubes à hémolyse,
- Oeses,
- Cartes VITEK 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies.

4. Réactifs

- Milieux de culture,
- Bouillon,
- Colorants de Gram,
- Réactif de la catalase,
- Réactif du test de l'oxydase,
- Réactif du test de coagulase,
- Réactif Urée-Indole-TDA.

5. Etape pré analytique

5.1. Nature du prélèvement

La nature du prélèvement doit être inscrite en renseignement clinique sur la fiche d'analyse qui accompagne le prélèvement. Le prélèvement doit être collecté soit dans un tube sec, soit par écouvillonnage et acheminé immédiatement au laboratoire, à défaut le conserver au frais pour le lendemain

5.2. Localisation

- Editer fiche de paillasse sur le Syslam (Système Informatique de Gestion du Laboratoire) en tapant **66** après avoir saisi le nom et le mot de passe de l'utilisateur qui est individuel.
- Choisir une **imprimante** (2 ou 4) au niveau de la réception, puis **lancement** et terminer par **sortir**.

Sur la fiche récupérée, notifier le type de prélèvement dans la liste **DA** à savoir :

cutané	oreille droite	narine droite	plaie	cathéter
	oreille gauche			
squames	œil droit	Lingual	péri anal	sécrétion
ongle	œil gauche	Gingival	gland	
nasal	Buccal	Gorge	pus	

-Préciser si le prélèvement est soit effectué au laboratoire, soit transmis ou soit apporté dans la liste **DC**.

Les listes **DE, DG, DI, DJA, DJB** sont à ignorer.

6. Etape analytique

6.1. Protocole de l'analyse

6.1.1. Préparation de la suspension

- Porter les milieux de culture (Gélose au sang – Drygalski – Chapman- Sabouraud – Mueller Hinton) à l'étuve pour séchage cinq (05) minutes environ,
- Préparer si possible une suspension à l'aide de Api Medium (si prélèvement par écouvillonnage),
- Identifier un tube à hémolyse contenant un bouillon de cœur-cervelle et y ajouter deux à trois gouttes de la suspension réalisée si la plaie est profonde,
- Si le prélèvement est dans un tube utiliser directement le prélèvement.

6.1.2. Examen direct

- Sur une lame, réaliser un étalement du prélèvement
- Sécher la lame sur la plaque chauffante préalablement régler à 50 °C,
- Passer à la coloration Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram. Réf**
- Passer à la coloration Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram. Réf. M07 ANA BAC- 021 V1**

N.B. Attention ne pas dépasser cette température au risque de déformer les germes.

6.1.3. Culture

- Les différents milieux de culture sontensemencés en fonction du Gram lu :
 - o Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO₂,
 - o Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO₂,
 - o Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,
 - o Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
 - o Chapman, incubé en aérobiose,
 - o Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
 - o CAN 2, incubé en aérobiose,
 - o Mueller Hinton, incubé en aérobiose,
 - o Bouillon cœur cervelle.

- Porter le tout à l'étuve pendant 24 heures.

NB : si les germes ne poussent pas sur les différents milieux de culture cités ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

6.1.4. Lecture et interprétation

- Identifier et faire les antibiogrammes sur les colonies suspectes
- Si la culture est stérile après 24 heures d'incubation, ré incuber les géloses au sang sous CO₂ pendant 48 heures,

En présence d'un **Bacille Gram négatif** :

- Lactose positive, faire l'identification et l'antibiogramme
- Lactose négative, faire le test à l'oxydase puis réaliser simultanément une identification et un antibiogramme en fonction du résultat du test,
 - En présence d'un **Cocci Gram positif**, catalase négative type Streptocoque, faire le Slidex Strepto-plus et étudier en fonction du contexte clinique (par exemple : la détermination du Streptococcus pneumo par le test d'optochine, Cf. mode opératoire du test à l'optochine),
 - En présence d'un **Cocci Gram positif**, catalase positive, mannitol positif, faire la coagulase puis passer à l'antibiogramme en cas de positivité,
 - Si la coagulase est négative discuter avec le biologiste ou ses assistants et étudier toujours en fonction du contexte clinique,
 - En **présence des levures**, identifier et faire l'antifongigramme,
 - Pour d'autres morphologies, discutées avec le biologiste ou ses assistants.

Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture : Pour d'éventuel cas de souchage (Bacilles Multi résistants, Staphylocoques Méthicyline résistants et Vancomycine résistants...).

6.1.5. Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir des disques sur milieu Muller Hinton ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Edition de Janvier 2007).
- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr des résultats donnés par l'appareil.
- Si l'antibiogramme est réalisé sur le VITEK 2 Compact, un système d'expertise incorporé à la base de données permet une interprétation plus détaillée des types de résistances. Devant une suspicion de présence d'une Bêta lactamase à spectre élargie (BLSE) faire la recherche sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.

6.2. Validation technique/ Critères de repasse

Ceux-ci sont réservés au technicien qui apprécie la pureté des colonies à travers les galeries API et celles des ATB. Si un contaminant est observé, purifier de nouveau à partir de la pureté pour une bonne identification et un bon antibiogramme.

6.3. Hygiène et sécurité

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel à 10 %
- Toujours manipulé en présence d'une flamme
- Toujours porté des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminations
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter de déposer les bouteilles au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de javel et au savon anti-bactéricide.

7. Etape post analytique

7.1. Validation biologique

Réservé au biologiste ou ses assistants. Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur. Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

7.2. Rendu des résultats

Préalablement noté sur la fiche de paillasse éditée sur le système informatique CODAT, saisir les résultats. Si possible téléphoner le résultat au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste ou ses assistants sont à mesure de téléphoner.

7.3. Gestion des déchets

Vider à chaque fin de journée les boites de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotchées et déportées à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux. Réf. P10 HYG- 002 V1**

7.4. Archivage des données

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives. Le système informatique du laboratoire archive aussi tous les dossiers des patients.

Annexe 3 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

Rédigé le:	30/06/2011	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Vérifié le:	30/06/2011	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	04/07/2011	Par : Pr Souleymane DIALLO II	SD	Visa :
Modifié le:	21/02/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Vérifié le :	23/02/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	10/03/2017	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	10/04/2016			Version N° 3
Date de revue :	21/02/2018			
Objet de la modification:	Ajout ensemencement gélose au chocolat si Cocci à GRAM positif type Staphylocoque			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité LRM

P: Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO: Mode opératoire d'utilisation du BacT/ALERT 3D Réf. M07 ANA BAC- 017 V1

Mode opératoire d'utilisation du Vitek 2 Compact Réf. M07 ANA BAC- 019 V1

Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07 ANA BAC- 014 V1

Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2

Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC- 023 V1

DE

I. Buts

Décrire les techniques de mise en évidence de la présence ou non des micro-organismes dans le sang dans le cadre de l'étude de la fièvre et des infections chez l'enfant drépanocytaire au Mali.

II. Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

. Principe

Identifier des micro-organismes pathogènes par ensemencement sur un certain nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés.

2. **Matériel**

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes,
- Pipettes pasteur,
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automates (mini API - VITEK 2 COMPACT),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK 2 COMPACT,
- BacT / ALERT 3D,
- Gants,
- Embouts stériles,
- Lames porte objets,
- Poubelle pour déchets usagés.

3. **Consommable**

- Gants,
- Embouts,
- Lame et lamelle,
- Anse,
- Cartes VITEK 2 COMPACT,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies,
- Flacons aérobie et anaérobie, flacon pédiatrique pour le BacT / ALERT 3D.

4. **Réactif**

- Milieux de culture : gélose chocolat, COS, Chapman, CAN2, CNA etc.
- Colorants de GRAM,
- Solutions de révélation

5. Pré analytique

5.1. Condition du prélèvement

Les prélèvements sont réalisés sous la responsabilité du biologiste et pratiqués par le personnel autorisé.

5.2. Matériels

- Deux solutions antiseptiques : alcool à 90°C, Bétadine dermique à 30%.
- Coton hydrophile : un coton imbibé d'alcool, un coton imbibé de Bétadine.
- Seringue de 10cc
- Une épicrotine
- Un garrot
- Boîte de récupération des aiguilles usagées
- Poubelles pour déchets biologiques.

Il est important de noter qu'il existe des critères d'inclusion des patients à l'hémoculture. Au centre de développement pour les vaccins du centre hospitalier universitaire Gabriel Touré se sont:

- Température non corrigée supérieure ou égale à 39°Celsius
- Suspicion d'infections bactériennes invasives : méningite, pleurésie, fièvre typhoïde, arthrite septique, péritonite...

Le préleveur s'assure de l'identité du patient (nom, prénom, âge) ; préparer le matériel nécessaire.

- Il pose le garrot, s'assure de l'asepsie en nettoyant le pli du bras à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, et enfin un coton imbibé de Bétadine.
- En fonction de l'âge, prélever 1 ml chez le nouveau-né, 2 ml enfant de 1-4 mois, 3 ml enfant de plus de 4 mois.

NB : Les flacons d'hémoculture doivent être bien mélangés et immédiatement acheminés au laboratoire après prélèvement. On retrouve au fond de chaque flacon des détecteurs de CO₂, dont le signal sera synonyme de présence de germes pathogènes dans la culture.

6. Analytique

Enregistrer les flacons dans le registre prévu pour la circonstance se trouvant dans le laboratoire de Microbiologie

6.1. Introduction des flacons dans le BacT/ALERT 3D.

- A partir de l'écran principal appuyé sur l'icône bleue,
- Scanner le code barre du flacon à l'aide de la douchette située sous l'écran de contrôle, ou le noter à l'aide du clavier se trouvant sous la douchette,
- Introduire dans le tiroir du jour et dans l'alvéole de son choix (la position n'est pas déterminée par l'automate)
- Fermer le tiroir et valider les saisies en appuyant sur V.

Remarque : Si la mise en place des flacons est supérieure à 2 minutes, une alarme s'active en colorant l'écran en rouge et en mettant le code erreur 20.

Dans ce cas, fermer le tiroir, toucher l'écran et l'alarme s'arrête. Renouveler la procédure d'introduction depuis le début pour introduire les flacons restants.

6.2. Que faire lorsqu'un flacon est déclaré soit positif, soit négatif ?

L'écran devient jaune et un chiffre apparaît sur la colonne notée BC.

Pour sortir le flacon positif du BacT/ALERT 3D

- Appuyer sur l'icône +
- Un voyant s'allume sur le tiroir où se trouve le flacon positif
- Ouvrir le tiroir, l'alvéole concernée clignote
- Sortir le flacon sans le scanner et refermer le tiroir et valider en appuyant sur V.

Pour sortir le flacon négatif du BacT/ALERT 3D

- Appuyer sur l'icône –
- Un voyant s'allume sur le ou les tiroirs concernés
- Ouvrir le tiroir et sortir les flacons dont le voyant est vert un à un (à chaque retrait, le voyant vert se met à clignoter)
- Refermer le tiroir et appuyer sur V.

6.3. Traitement des flacons

- Les flacons sortis négatif* ne feront pas l'objet d'étude et le résultat sera saisi « stérile » tout en mentionnant la date de sortie.
- Les flacons sortis positif*
- Désinfecter la partie caoutchouc du flacon avec de l'alcool iodé

- Mélanger voir vortexer le flacon
- Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille associée à une seringue de 10 ml
- Si le bouchon du flacon (en particulier pour le flacon anaérobie) est bombé, évoquant la présence de gaz dans le flacon, retirer le piston, laisser le gaz s'échapper via l'aiguille, puis passer à l'ensemencement.
 - Examen direct et mise en culture*
- Sur une lame porter le numéro d'identification du patient, recouvrir d'une lamelle une à deux gouttes du bouillon bien mélangé et observer au microscope des éventuels germes mobiles.
- Après observation retirer la lamelle, laisser sécher sur la paillasse et procéder à la coloration de GRAM et lire aussitôt.

Cf. Mode opératoire de la coloration de GRAM Réf. M07 ANA BAC- 022 V2

N.B. : La coloration de GRAM permet au Biologiste ou à ses assistants d'informer le site clinique Pneumobama à la pédiatrie du résultat obtenu. Selon la morphologie lue, ensemercer :

- Si **bacille à GRAM négatif**, ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Drigalski et sur une gélose au sang frais (COS) à incuber sous CO₂,
- Si **cocci à GRAM positif type Staphylocoque**(en grappe de raisin), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Chapman, sur une gélose au sang frais **et au chocolat** à incuber sous CO₂,
- Si **cocci à GRAM positif type Streptocoque** (en chaînette), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu gélose au sang frais (COS) incubée sous CO₂ ;
- Si présence **de levures** ensemercer un sabouraud ou un CAN2.

Pour le flacon anaérobie, quelqu'en soit le GRAM lu ensemercer une gélose au sang frais et incuber en anaérobiose par le biais de sachet ana (genebag)

6.4. Lecture et interprétation

- Bacille à GRAM négatif type entérobactérie oxydase négative, identification galerie API 20E ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme,
- Bacille à GRAM négatif type non entérobactérie oxydase positive, identification galerie API 20 NE ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme **Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**

- Cocci à GRAM positif type Streptocoque, identification galerie API 32 Streptocoques ou carte Vitek GP tout en ensemençant une gélose au sang cuit à partir de la suspension bactérienne en posant un disque d'optochine **Cf. Mode opératoire du test à l'optochine Réf. M07 ANA BAC- 031 V2**
- Cocci à GRAM positif type Staphylocoque :

Si catalase positive, slidex négatif et mannitol négatif Staphylocoque à coagulase négative à discuter avec le Biologiste ou ses assistants,

Si catalase positive, slidex positif et mannitol positif, identification galerie API Staphylocoques ou carte Vitek suivi de l'antibiogramme. **Cf. Mode opératoire du test de la coagulase Réf. M07 ANA BAC-023 V1**

- Autre morphologie, à discuter avec le biologiste ou ses assistants.
- Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture en fonction du germe.

6.5. Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir de disques sur milieu M.H ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur la fiche des diverses CMI prévues pour la circonstance.
- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr sur la sensibilité – intermédiaire – résistance donné par l'appareil.
- Si cas d'une **Bêta lactamine à spectre élargie** faire la recherche de BLSE sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.
- Réalisé sur le VITEK 2 COMPACT une éventuelle interprétation devient difficile en ce sens que tout se passe dans la machine et que les cartes ne sont pas faciles à interpréter. L'essentiel est de ne pas confondre le GRAM (positif et négatif).

6.6. Validation technique / Critères de repasse

Réservé au Technicien qui apprécie la pureté de ces colonies à travers les galeries API et celles des ATB.

Si un contaminant est observé ré purifier à partir de la pureté pour une bonne identification et antibiogramme.

6.7. Résultat

Les résultats sont validés automatiquement par le technicien grâce à une connexion bidirectionnelle. Si cette connexion est dérangée, les résultats peuvent être saisis manuellement sur le système CODAT.

Les résultats de l'étude Pneumobama sont enregistrés dans les documents y afférant.

6.8. Hygiène et sécurité

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel
- Toujours manipulé en présence d'une flamme ou sous une hotte.
- Toujours porté des gants, des chaussures fermées si possible un masque de protection
- Eviter de toucher les portails, les appareils et les microscopes avec les gants
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire
- Bien ranger les milieux de culture et les bouillons afin d'éviter les contaminants
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter les bouteilles déposées au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de robinet et au savon anti-bactéricide.

7. Post analytique

7.1. Validation Biologique

Réservé au biologiste ou ses assistants

Elle s'effectue en confrontant l'ensemble des résultats avec les éléments cliniques apportés par la discussion avec le médecin prescripteur.

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu

7.2. Hygiène et sécurité

Lors des manipulations, il faut toujours :

- porter des gants
- Essuyer l'automate avec un papier essuie tout imbibé de javel dilué au 1/10
- Mettre les matériels souillés dans la poubelle réservée aux déchets contaminés
- Nettoyage de la paillasse avec de l'eau de javel à 3° Cl au début et à la fin de la journée.

7.3. Gestion des déchets

Vider à chaque fin de journée les boites de pétri utilisées datant de deux jours et les sachets poubelle qui doivent être bien scotché et déporté à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts déposés pour la circonstance.

7.4. Archivage

Les dossiers en fin d'étude doivent être mis dans un carton où est inscrite la période d'utilisation et une fois remplie le transférer au magasin où une étagère est prévue pour les archives

Annexe 4 : PROCEDURE D'IDENTIFICATION DES BACTERIES AU LRM

Rédigé le:	22/02/2016	Par : Dr Lassina TIMBINE	LT	Visa :
Vérifié le:	22/02/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	22/02/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	22/02/2017	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	28/02/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	22/03/2016			Version N° 1
Date de revue :	22/02/2017			
Objet de la modification:	Création de document Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur

- Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire la procédure d'identification des bactéries au LRM.

II - Domaines et personnel concerné

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

PROCEDURE D'IDENTIFICATION DES BACTERIES AU LRM

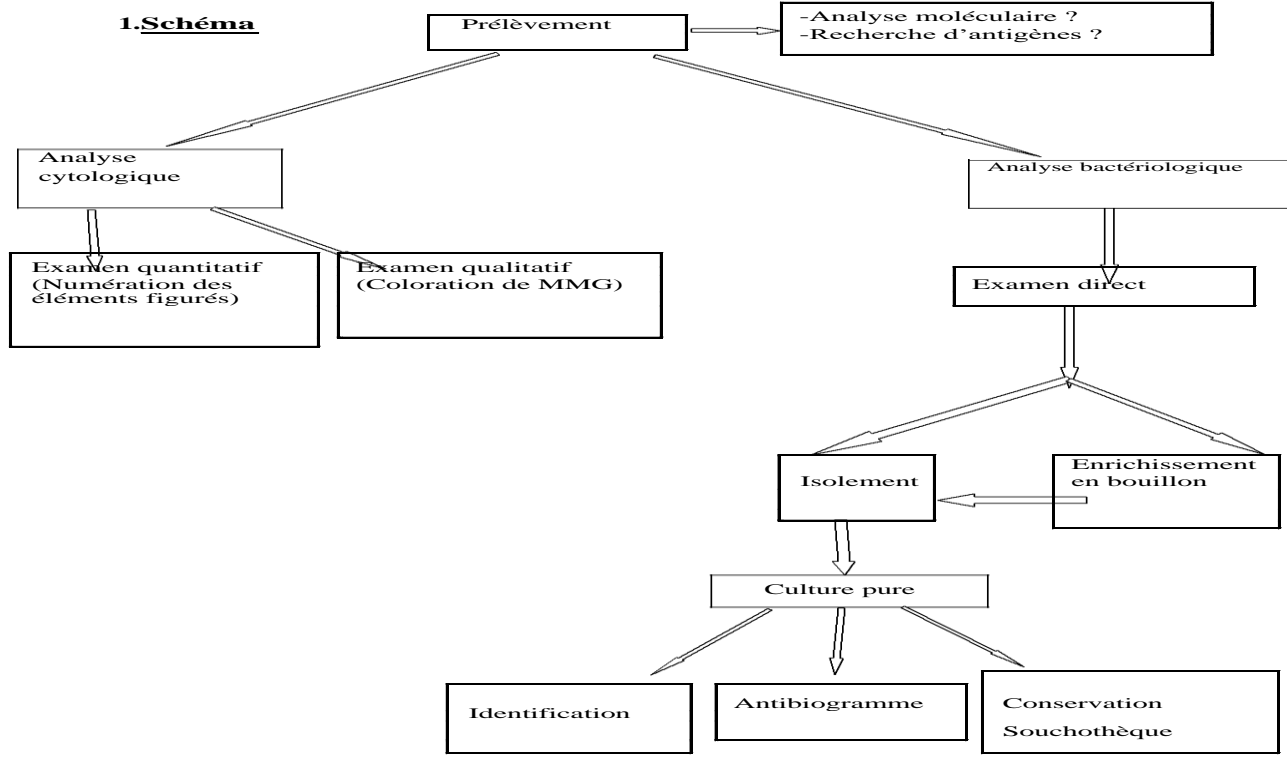
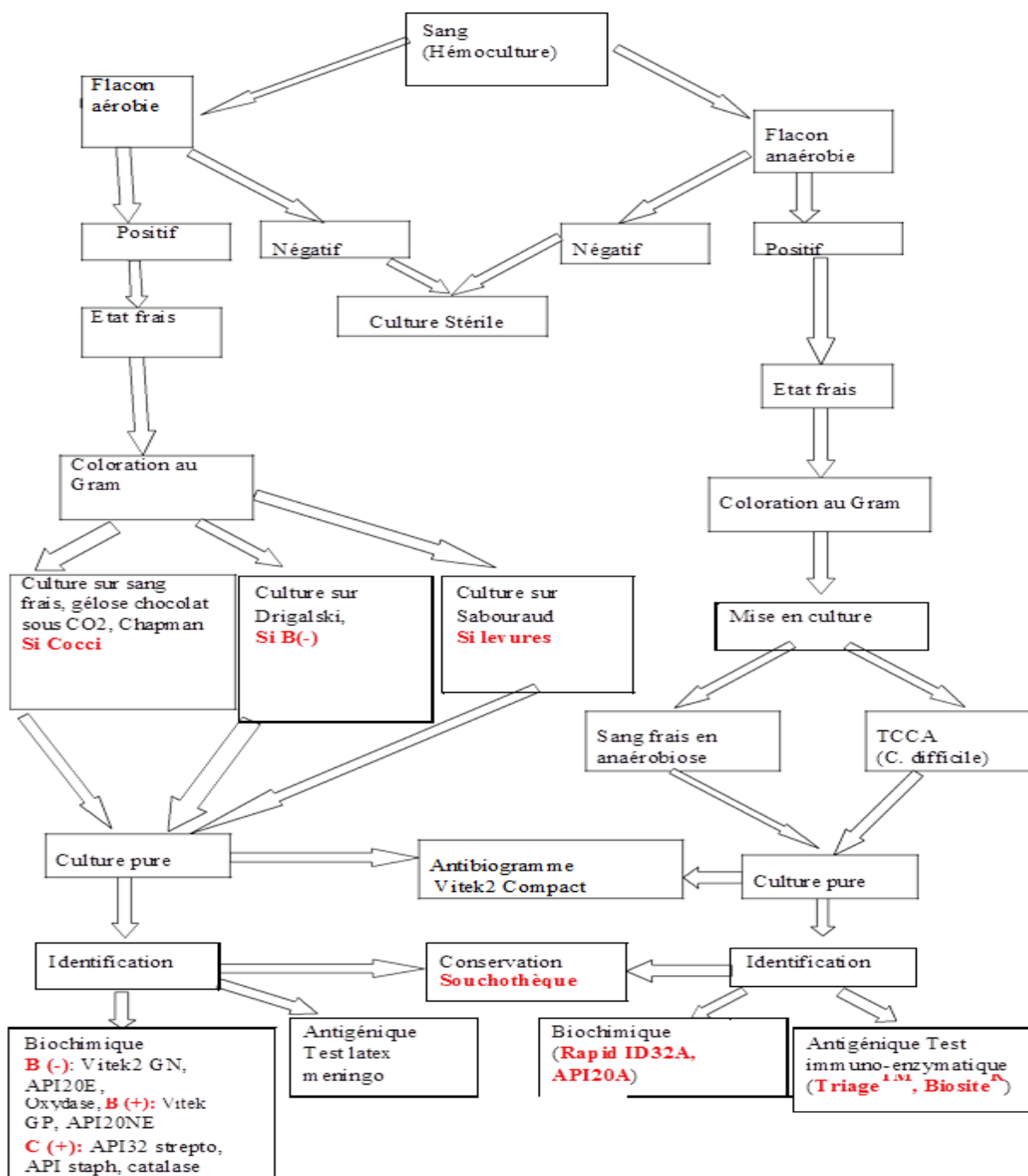
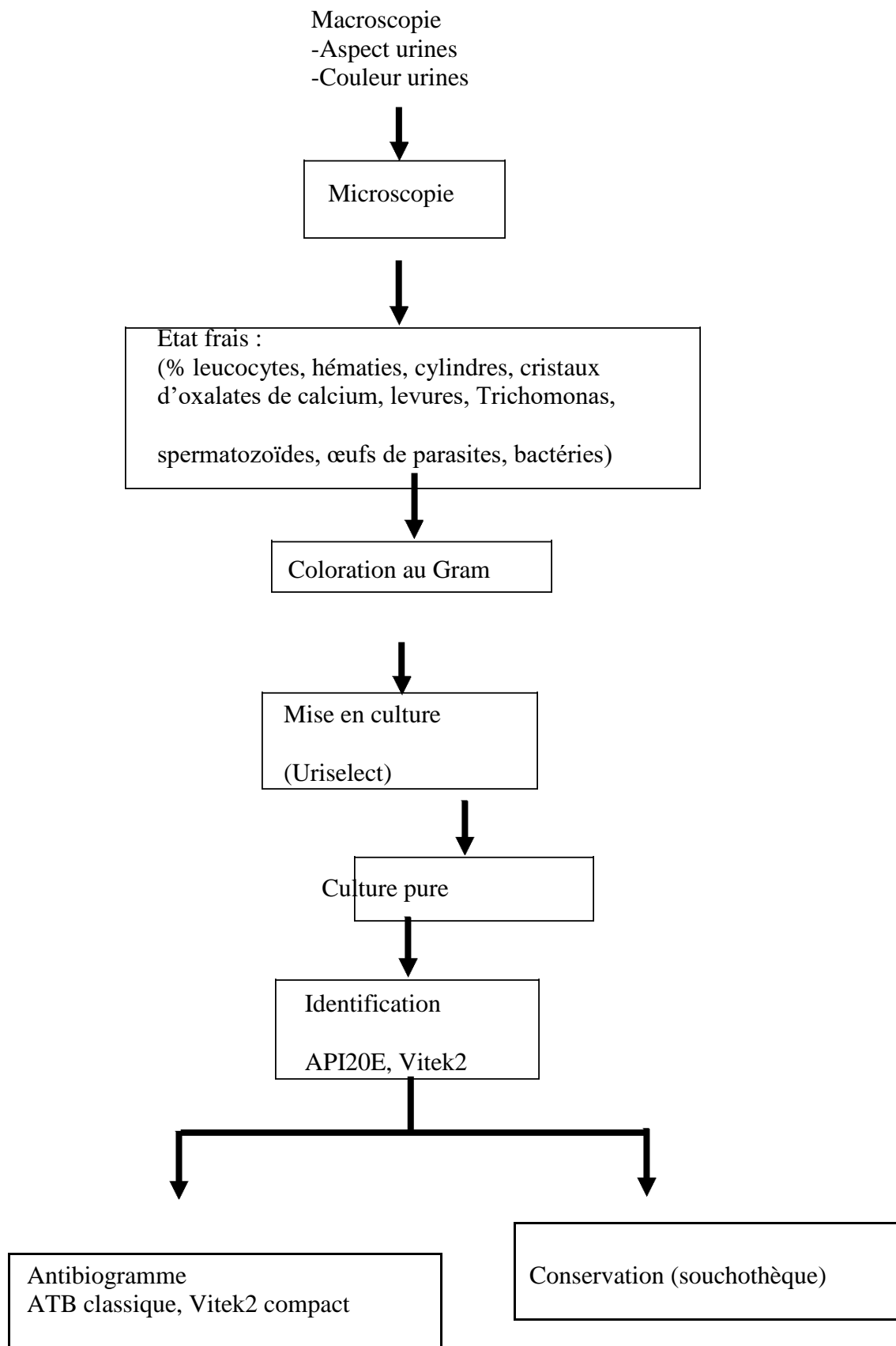
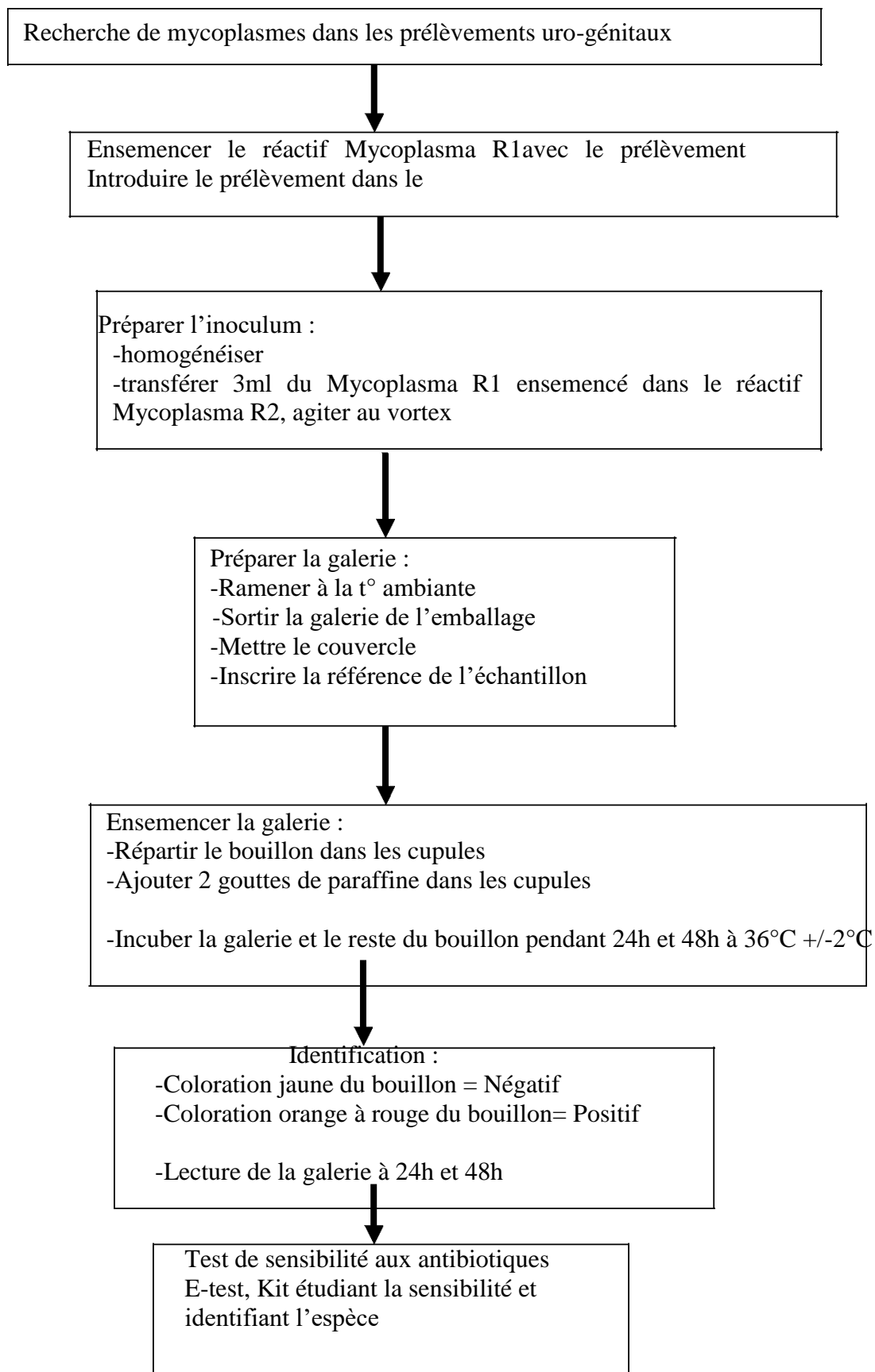


Schéma général de la démarche de l'analyse bactériologie



Urines (ECBU)





Annexe 5 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	28/02/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Fatoumata MAIGA	FM	Visa :
Vérifié le :	21/04/2016	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Approuvé le:	21/04/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	21/05/2016	Par :		Version N° 2
Date de revue :	21/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- **Dossier commun sur le serveur Documents**

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire la technique du test de l'oxydase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

**MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE
L'OXYDASE**

1. But du test :

La recherche de l'oxydase permet :

- ☐ **D'identifier le genre *Neisseria* spp (positif)**
- ☐ **De séparer les Entérobactéries (négatif) des espèces du genre *Pseudomonas* (positifs pour la plupart)**
- ☐ **De différencier *Moraxella* (positif) et *Neisseria* (positif) d'*Acinetobacter* (négatif)**
- ☐ **De différencier *Pseudomonas maltophilia* (négatif) des autres *Pseudomonas* sp (positif)**
- ☐ **D'aider à l'identification d'*Aeromonas* (positif), *Alcaligenes* (positif), *Branhamella* (positif) et *Yersinia* (négatif).**

2. Principe

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif phénylènediamine, pour former un composé coloré en violet, l'indophénol.

L'acide ascorbique, incorporé dans le réactif, agit en tant qu'agent réducteur pour limiter l'auto-oxydation et améliorer la stabilité du réactif. Cette formulation est basée sur la formule de la réactive oxydase de Kovac.

3. Matériel

- ☐ Oese (en platine, plastique).
- ☐ Disques non imprégnés de diamètre 6 mm.

4. Condition de stockage

- ☐ Les réactifs se conservent entre 18°C et 25°C dans leur coffret jusqu'à la date de péremption.
- ☐ Ne pas congeler.
- ☐ Conserver à l'abri de la lumière.
- ☐ Le réactif oxydase s'auto-oxyde rapidement et perd sa sensibilité. Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 24 heures.

5. Nature de l'échantillon

L'échantillon est constitué d'une colonie isolée pour laquelle on veut détecter l'enzyme cytochrome oxydase. Cette colonie doit être issue d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux de culture gélosés solides.

6. Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée à l'aide des souches suivantes cultivées sur géloses Trypcase-

Soja(ou Drygalski) :

- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Escherichia coli* ATCC 25922

Souche	Résultats
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Positif : coloration violette
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Négatif : pas de coloration

7. Réalisation du test

- Placer le flacon compte-gouttes dans le briseur d'ampoule.
- Tapoter le fond du flacon pour éliminer les bulles qui auraient pu s'y former.
- Saisir le milieu de l'ensemble flacon/briseur et appuyer doucement pour briser l'ampoule.
- Distribuer précisément une goutte de réactif sur un disque non imprégné de diamètre 6 mm.
- Etaler la colonie sur le disque.

8. Résultat

- Lecture et interprétation**

- o L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.
- o Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif.

NB :

- La réaction d'oxydase ne doit pas être réalisée sur des colonies obtenues sur gélose EMB ou CHAPMAN 2, ni sur des colonies issues d'une culture de 48 heures sur des milieux gélosés solides.
- La recherche de l'oxydase ne doit pas être effectuée sur des colonies isolées présentant une coloration spontanée (couleur violette, rose, noire...). Dans ce cas, la lecture du test est impossible.
- L'utilisation d'un volume de réactif trop important peut entraîner des résultats faussement négatifs. N'utiliser qu'une seule goutte de réactif comme indiqué dans le mode opératoire.
- Il est conseillé d'utiliser une oese ou une aiguille en platine ou en plastique pour le test de l'oxydase. Toute trace de fer (nichrome) peut catalyser la réaction de l'oxydase et conduire à une réaction faussement positive.
- Tout réactif partiellement utilisé doit être éliminé au bout de 12 heures.
- Les genres faiblement producteurs d'oxydase comme les *Pasteurella*, peuvent donner des résultats négatifs.
- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir en cas de cultures mixtes de *Pseudomonas* et *Neisseria*. Une substance inhibitrice est produite par *Pseudomonas spp.* interférant avec la production d'oxydase de *Neisseria spp.*

9. Gestion des déchets

Les réactifs non utilisés peuvent être éliminés comme déchets non dangereux.

Éliminer les réactifs 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.

Annexe 6 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

Rédigé le:	24/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	03/03/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	Visa :
Vérifié le :	22/04/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	22/04/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	22/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	22/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire la technique du test de la catalase en microbiologie.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

1. But :

La recherche de la catalase est réalisée pour différencier le genre :

- ☐ *Sretptococcus* (catalase négative) du genre *Staphylococcus* (catalase positive)
- ☐ *Bacillus* (catalase positive) du genre *Clostridium* (catalase négative)
- ☐ *Listeria* (catalase positive) et/ou *Corynebacterium* (catalase positive) du genre *Erysipelothrix* (catalase négative)

2. Principe

La catalase est une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La présence de catalase est détectée chez les micro-organismes par une libération d'oxygène à partir d'eau oxygénée.

La présence d'un agent épaississant et d'un colorant facilitent l'observation du dégagement gazeux.

3. Matériel

- Le réactif de catalase
- La lame porte-objet ;
- Le bâtonnet ;
- La souche pure.

4. Contrôle de qualité

L'activité du réactif peut être testée vis à vis des souches suivantes :

- ☐ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la catalase est **positive**
- ☐ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la catalase est **négative**

5. Réalisation du test

Laisser les flacons revenir à température ambiante

☐ Test sur lame

o **Déposer sur la lame une goutte d’ID color catalase ; o Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ;**

o **A l’aide d’un bâtonnet, bien triturer.**

☐ Test direct sur le milieu de culture

• **Déposer une goutte d’ID color catalase directement sur la colonie.**

6. Résultat

Le test doit être réalisé sur des colonies de 18 à 24 heures après incubation. Les colonies plus âgées pourraient perdre leur catalase et donner des faux négatifs. La présence de catalase se matérialise par une production de bulles ;

Les entérobactéries sont toutes des bactéries catalase positive, à l’exception de *Shigella dysenteriae* ; Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont en général, catalase positive telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*... ;

Quelques cocci à Gram positif son catalase positive comme les Staphylocoques.

7. Gestion des déchets

Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune.

Annexe 7 : MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Rédigé le:	25/02/2005	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	25/02/2005	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	02/03/2005	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	TZ	Visa :
Vérifié le :	25/03/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/04/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE		Visa :
Mise en application :	25/05/2016			Version N° 2
Date de revue :	25/04/2017			
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

Dossier commun sur le serveur Documents

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de coloration de Gram.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

1. Principe

C'est la coloration de base en bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur structure. Elle est l'une des caractères essentiels de la classification des bactéries. Plusieurs facteurs vont intervenir dans cette coloration :

- La différence de composition chimique de bactéries ;
- La différence de perméabilité de la paroi bactérienne à l'alcool-acétone.

2. Matériel

- Microscope ;
- Blouse ;
- Bac de coloration ;
- Plaque chauffante ;
- Bec bunsen ;
- Centrifugeuse.

3. Consommable

- Gants ;
- Lames porte objet ;
- Tube conique ;

- Pipette pasteur.

4. **Réactif**

- Colorants : violet de gentiane, le lugol, l'alcool-acétone, la fuchsine.
- L'huile d'immersion.

5. **Nature du prélèvement**

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

6. **Contrôle de qualité**

Les lames positives (frottis préparés avec une souche de bactérie connue) sont conservées et utilisées comme lames de référence.

7. **Technique**

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;
- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30 secondes ;
- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ;
- Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

8. **Résultat**

A la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatifs : coloration rose
- Bactéries Gram positifs : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet

Annexe 8 : MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DE LA CELLULE DE KOVA

Rédigé le:	21/02/2013	Par : Tony ZITTI	TZ	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/2017	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	25/04/2016			Version N° 1
Date de revue :	25/03/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité :

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

**P: Procédure de la réalisation des analyses en bactériologie
Procédure de gestion des déchets**

MO:

D:

E:

I – But

Décrire le mode d'utilisation de la cellule de Kova.

II - Domaines et personnels concernés

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette cellule.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

**MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DE LA
CELLULE DE KOVA**

1. Principe

Il consiste à quantifier les cellules (leucocytes, hématies, cellules épithéliales, cristaux, cylindres, œufs de schistosomes...) dans les urines ou dans les liquides de ponction à l'aide de la cellule de Kova vue au microscope optique à l'objectif x10 puis x40.

2. Matériel

- Microscope ;
- Micropipettes.
- Cellule de Kova

3. Consommables

- Gants ;
- Embouts ;
- Essuie- tout.

4. Nature du prélèvement

Les urines et les liquides de ponction

5. Protocole

- Mélanger et pipeter 10µl de l'échantillon;
- Remplir le quadrant de la cellule de KOVA.

6. Règles d'utilisation de la cellule de Kova

- Chaque cellule contient 10 grilles de comptage séparées ;
- Chaque grille est constituée de 9 cases, chacune étant constituée de 9 petits carrés ;
- Chaque cellule à un volume de 1 µl = 1mm³ ;
- On ne compte pas les éléments qui sont sur les lignes (qui représentent 1/9 de la surface) ;
- Le nombre d'éléments comptés dans 1 case doit être multiplié par 10 pour obtenir un nombre par µl ou mm³ ;
- Le nombre d'éléments comptés dans un carré doit être multiplié par 100 ;
- Ne pas oublier de multiplier par le facteur de dilution si l'échantillon a été dilué ;
- Penser à rayer les chambres déjà utilisées à l'aide d'un marqueur ;
- Regarder au microscope à l'objectif X10 puis à l'objectif X40 et quantifier les éléments à savoir :
 - o Pour les urines : leucocytes, hématies, cristaux, cylindres, cellules épithéliales... ;
 - o Pour les liquides de ponction : leucocytes et hématies.

- En ce qui concerne les urines, lorsqu' une leucocyturie est présente, faire une coloration de Gram à partir du culot urinaire pour orienter le diagnostic.

Annexe 9 : MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Abderrhamane MAIGA	AMA	Visa :
Vérifié le:	14/03/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGA	JO	Visa :
Approuvé le:	14/03/2016	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	14/03/2017	Par : Judicaël OUEDRAOGA	JO	Visa :
Approuvé le:	14/03/2017	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	14/04/2016			Version N° 1
Date de revue :	14/03/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur Documents

Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire l'utilisation en routine du Mini Api.

II - Domaines et personnel concerné

Secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé cet appareil.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API

. **Principe**

Le Mini API permet deux types de lecture.

1.1. La lecture turbidimétrique

Elle est destinée aux galeries turbidimétrique.

Exemple :

ID 32 GN

ID 32 C

TB UR

Turbidimétrie : mesure de l'intensité de la lumière transmise (T) inversement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Néphélométrie : mesure de l'intensité de la lumière diffusée (D) à 30°C directement proportionnelle à la croissance bactérienne.

Ces deux mesures permettent d'évaluer la densité bactérienne dans chaque cupule.

Le cycle d'une lecture turbidimétrique se fait en deux étapes :

1ère étape :

Entrée du chariot porte galerie et détection du code de la galerie **2ème étape :**

Mesure sous la position sans filtre puis sortie du chariot porte galerie

Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

1.2. La lecture colorimétrique

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

Exemple:

ID 32 STAPH

ID 32 E

Rapid ID 32 A

Rapid ID 32 STREP

Le Mini API effectue pour chaque cupule une mesure de transmission de la lumière dans 4 régions du spectre visible.

Le cycle d'une lecture colorimétrique se fait en 4 étapes :

1ère étape :

- 1ère entrée du chariot porte galerie
- Détection du code de la galerie
- Mesure sous filtre K60

2ème étape :

- 1ère sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous filtre K40

3ème étape :

- 2ème entrée du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT bleu

4ème étape :

- 2ème sortie du chariot porte galerie
- Mesure sous le filtre DT vert
- Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

2. Mise en route

Il faut :

Mettre le Mini API sous tension en appuyant sur l'interrupteur d'alimentation (marche/arrêt) à l'arrière de l'appareil.

A la mise sous tension, la configuration interne du système est testée (identification du microprocesseur, taille de la mémoire).

Deux signaux sonores retentissent. Le Mini API a effectué avec succès les tests internes. L'écran affiche brièvement la page de présentation du logiciel Mini API puis le menu principal apparaît.

3. Procédure d'utilisation

3.1. Description du logiciel

Le logiciel Mini API est composé de 6 modules :



SAISIE.

Ce module permet à l'utilisateur de créer les dossiers patients gérés par le Mini API.

Un dossier patient est identifié par une référence unique.

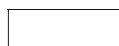
L'examen d'un dossier patient contient les informations relatives à un prélèvement.

Les résultats d'identification et d'antibiogramme concernant un prélèvement sont affectés d'un numéro d'ordre géré automatiquement.

L'examen d'un dossier patient peut contenir jusqu'à 5 germes.

CONSULT.

Ce module permet de visualiser les données patientes et de vérifier l'examen et les résultats associés.



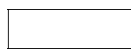
COMM.

Ce module permet l'échange d'information entre le Mini API et le système informatique du laboratoire.



EXPERT.

Ce module intègre la gestion d'un système EXPERT permettant l'interprétation des résultats bruts des antibiogrammes enregistrés.



OUTILS.

Ce module regroupe tous les utilitaires du logiciel : Création et Mise à jour des Thésaurus, Sauvegarde/ Restauration / Extraction, Destruction des données.

Api /ATB.

Ce module permet d'effectuer des lectures de galeries d'identification ou d'antibiogramme sans créer un dossier patient et d'examen associé. Les résultats pour l'identification et l'antibiogramme ne sont pas enregistrés. Les résultats de l'antibiogramme ne sont pas expertisés.

3.2. Réalisation d'un test

Avant d'effectuer la lecture des galeries, il faut :

1ère étape :

- Mettre en marche Mini API.
- Attendre au moins 15 minutes (préchauffage) avant de commencer la lecture des galeries.
- Création d'un dossier patient.

2ème étape :

- Préparation des galeries pour la lecture.
- Enlever le couvercle des galeries.

- Ajouter les réactifs nécessaires pour la révélation de certains tests (se reporter à la notice d'utilisation des galeries).

3ème étape :

- Tirer l'arceau de protection.

Attention :

Il est impératif de tirer complètement l'arceau de protection pour procéder à la sortie du chariot porte galerie.

L'arceau de protection délimite la surface pour le libre déplacement du chariot porte galerie.

Il ne doit pas être utilisé comme poignet pour déplacer l'instrument. Ne rien poser sur l'arceau de protection lorsque celui-ci est tiré.

La sortie du chariot porte galerie est effectuée automatiquement par le logiciel Mini API au moment de la lecture automatique des galeries.

Important :

Ne pas toucher le chariot porte galerie durant le mouvement de celui-ci.

4ème étape :

- Positionner la galerie sur le chariot porte galerie

5ème étape : lecture des galeries :

- La lecture des galeries est déclenchée par le logiciel Mini API
- La lecture des galeries est automatique
- Le code de la galerie est lu et les résultats interprétés générant ainsi le traitement de la galerie correspondante: lecture turbinéphéléométrique ou colorimétrique.

4. Arrêt du Mini Api

Lorsque le menu principal de mini Api est affiché, sortir de l'application

- Appuyer sur <SUPPR>
- Eteindre l'appareil
- Rentrer l'arceau de protection

5. Gestion des documents

Type de document	Contenant	Lieu	Durée de conservation
Document qualité	Classeur Assurance qualité Mini Api	Laboratoire Bactériologie	3 ans après la fin de leur utilisation
Traçabilité AQ	Fiche de vie Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après
Document fabricant	Manuel d'utilisation et Manuel Instrument Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et 3 ans après

Annexe 10 : PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Rédigé le:	02 /06 /2011	Par : Quentin MASSOT	QM	Visa :
Vérifié le:	03/06/2011	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	03/06/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	03/06/2016	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	03/06/2016	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	03/07/2016			Version N° 1
Date de revue :	03/06/2017			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

X Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

1 Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P : Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V1

MO:

D :

E :

I – Buts

Décrire la méthode pour préparer les milieux de cultures essentiels à l'étude des bactéries. **II. Domaines et personnels concernés**

Tout le secteur de Bactériologie du laboratoire Rodolphe Mérieux. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

IV. Références

V. Contenu

PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

1. Principe

Cette procédure doit expliquer la façon de préparer les milieux de cultures, qui sont nécessaires aux analyses de bactériologie.

2. Matériel

- Erlenmeyer ;
- Spatule ;
- Barreau aimanté.

3. Consommable

- Papier d'aluminium

4. Réactif

- Eau distillée

- Milieux de cultures déshydratés (voir tableau ci-dessous).

5. Mode Opérateur

- Stériliser d'abord un erlenmeyer de la contenance souhaitée.
- Ajuster à la quantité souhaitée l'erlenmeyer avec de l'eau distillée et ajouter le barreau aimanté.
- Peser puis insérer la poudre déshydratée du milieu désiré dans l'erlenmeyer : Le rapport quantité / poids est noté sur chaque boîte ainsi que sur le tableau ci-dessous.
- Porter le tout à ébullition sur une plaque chauffante avec l'agitateur jusqu'à ébullition

La nécessité de l'autoclavage est notée sur les boîtes et sur le tableau ci-dessous.

Milieu	Quantité de poudre pour 300 Millilitres d'eau	Quantité de poudre pour 1 litre d'eau	Autoclavage
Bouillon Cœur / Cerveille	11,10 g	37 g	15 mn à 120°C
Müeller Hinton	10,50 g	35g	15 mn à 121°C
Chapman	33,30 g	111 g	15 mn à 120°C
UriSelect 4	17,04 g	56,8 g	15 mn à 120°C
Drigalsky	14,70 g	49 g	15 mn à 115°C
Hektoen	22,50 g	75 g	Non : Bain marie (45-50°C) jusqu'au coulage
Gélose au sang Choco (Columbia)	11,70 g	39 g	15 mn à 120°C
Gélose saboureau Chloramphénicol	13,65 g	45,5 g	15 mn à 120°C

6. Hygiène et sécurité

6.1. Evaluation des risques

	Indice	Degré de gravité
Gravité	1	Très peu grave
	2	Peu grave
	3	Grave
	4	Très grave
	5	Excessivement grave- Mortel

Type de Risque	Circonstances	Localité	Risque	En cause	Gravité	Moyen(s) de prévention
Infectieux	Stériliser la verrerie dans l'autoclave	Salle des milieux de culture	Contamination	Manutention sans gants	2	Mettre des gants lors du déplacement des objets et bien se laver les mains après.
Infectieux	Préparation de milieux	Salle des milieux de culture	Contamination des milieux = résultats faux	Salle insalubre	2	Nettoyer le local afin que toute contamination soit au maximum évitée
Electrique	Onduleur dans une pièce humide et sale	Salle des milieux de culture	Court circuit	Poussière et humidité	3	Aérer et nettoyer régulièrement
		Salle	Ne pas pouvoir	Dysfonctionnement		Bien entretenir les

Machinerie	Panne autoclave	des milieux de culture	stériliser des matériaux	de l'appareil / mauvais entretien	3	machines / avoir des pièces de rechange
Machinerie	Panne plaques chauffantes	Salle des milieux de culture	Ne plus pouvoir préparer les milieux	Dysfonctionnement de l'appareil	3	Avoir une plaque de rechange disponible
Chute d'objets / Produits	Chute d'objets lourds: casque de moto / verrerie	Salle des milieux de culture	Blessure, casse	Objets cassant en hauteur, objets qui n'ont pas à être là	3	Mettre ailleurs les objets qui n'ont pas à être là et essayer de ranger la verrerie sur la paillasse

6.2. Nettoyage de la salle

La salle doit être aérée puis nettoyée hebdomadairement afin de garantir une atmosphère la moins chargée possiblement en poussières.

6.3. Evacuation des eaux usées

L'évacuation des eaux usées se fait par l'évacuation au sol, situé sous le lavabo (autoclave). Il faut bien faire attention à mettre le tuyau d'évacuation, dans le trou afin d'éviter au maximum les projections d'eau et /ou inondation dans la salle

9. Archivage

L'archivage de la procédure se fera lors de toute modification faite sur la préparation des milieux de culture (ajout ou retrait de milieux de la liste, arrêt des préparations, changement de méthode

Annexe 11 : MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Vérifié le:	22/02/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	22/02/2013	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:	22/02/2016	Par : Dr Lassina TIMBINE	LT	Visa :
Vérifié le :	22/02/2017	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	25/02/2017	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	22/02/2016			Version N° 2
Date de revue :	22/02/2018			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
Archivé le :				

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité
- Dossier commun sur le serveur

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

P:

MO:

D:

E:

I – Buts

Décrire le mode opératoire de la technique de souchothèque.

II - Domaines et personnels concernés

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique.

III - Abréviations/Définitions

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

IV – Références

V – Contenu

MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE SOUCHOTHEQUE

1. Principe

Le souchothèque est un moyen permettant de conserver les souches bactériennes. La température de conservation à longue durée pour les bouillons glycélinés est de -80°C .

Pour la conservation à température ambiante la culture se fait en gélose profonde dans des tubes à hémolyse sellés.

2. Matériel

- Portoir tube
- Tube à hémolyse
- Micropipettes
- Embouts
- Cryotubes
- Tubes à vis
- Marqueur
- Congélateur (-80°C)

3. Réactif

- Glycérol
- Milieu Müller Hinton ou BCC ou TCS

4. Nature du prélèvement

Souche pure des bactéries.

5. Enregistrement

Cahier de souchothèque et fichier électronique.

6. Technique

6.1. Conservation longue durée

- Prendre un tube à hémolyse sur lequel on portera le numéro d'identification du patient et le nom de la bactérie à soucher ;
- Prendre le milieu Müller Hinton (MH) et remplir le tube à hémolyse jusqu'à moitié ;
- Prélever à l'aide d'une hanse quelques colonies isolées à partir de la purification qu'on introduira dans le MH, bien mélanger ;
- Mettre une étiquette portant le numéro de la souche correspondant aux trois 1ère lettres et chiffres du CODAT plus deux lettres de la souche plus le numéro d'ordre ; ex : W04ECO001 (1er E. coli souche en Avril 2012) ;
- Prendre soin de porter l'enregistrement dans un classeur prévu à cet effet ;
- Mesurer 800µl de la suspension déjà préparée, mélanger avec 200µl de glycérol puis agiter au vortex répartir dans les Cryotubes et conserver à -80°C.
- Préparer un bouillon de Cœur Cerveille mélanger avec du glycérol à 15% répartir le mélange dans des Cryotubes à vis.
- Prendre les colonies d'une culture pure de 24heures de la souche à conserver isolée sur MH par raclage à l'aide d'écouvillon puis plonger l'écouvillon dans le bouillon ; triturer légèrement sur les parois des Cryotubes et conserver à -80°C.
- Ensemencer en culture profonde la souche dans du MH solide en tube, celer le tube à la flamme et conserver à la température ambiante.

6.2. Conservation courte durée

Elle consiste à effectuer des repiquages en milieu gélosé en tube et conservation à l'obscurité à la température ambiante.

7. Application des contrôles de qualité en bactériologie à partir des souches de référence

Pour cette activité il est nécessaire de rendre les souches de référence disponibles les souches de référence.

8. Mise en place des évaluations externes de la qualité en bactériologie

Pour cette activité il y a lieu de choisir des laboratoires de référence soit à Lyon ou dans autres pays où le plateau technique est plus élevé.

NB : deux thèmes de recherche sur les résistances bactériennes aux antibiotiques.

9. Gestion des déchets

Les objets souillés sont éliminés dans la poubelle jaune (contaminant)

Résumé

Introduction : *Klebsiella pneumoniae* est un pathogène opportuniste découvert depuis plus d'une centaine d'années. Aujourd'hui elle est le chef de file des germes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter, des épidémies sont causées par des souches résistantes à une large variété d'antibiotiques. Le but de notre étude était **d'évaluer !!!!!**

Méthode : Les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées et identifiées par leurs caractères morphologiques et biochimiques à partir des méthodes classiques de bactériologie.

Leur sensibilité aux antibiotiques a été testée par la méthode de diffusion ou le Vitek 2 compact selon les recommandations du CA-SFM version 2017. La souche de référence *E coli* ATCC 25922.

Résultats : La fréquence de la résistance chez cette espèce est estimée à 19.04% aux quinolones et 23.80% aux céphalosporines de troisième génération.

Nos résultats montrent la présence de 35 souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) soit 55.88%.

Conclusion : Cette étude nous montre que, un grand nombre de nos souches de *Klebsiella pneumoniae* ont présenté un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les β -lactamines, les aminosides, et les quinolones.

Par ailleurs l'imipénème, la ceftazidime et fosfomicine restent les molécules les plus actives.

Mots clés: *Klebsiella pneumoniae*-antibiotiques-résistance-BLSE-CICM-Mali.

SERMENT DE GALIEN

- Je jure en présence des maîtres de cette Faculté, des conseillers de l'ordre des Pharmaciens et de mes chers condisciples.
- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;
- D'exercer dans l'intérêt de la santé publique ma profession, avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine. En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.
- Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.
- Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Je le jure !

