

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

REPUBLIQUE 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**



Année Universitaire 2017 – 2018

N°...../

**TITRE**

**SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE  
AUX ANTIMICROBIENS DES SOUCHES DE  
PROTEUS ISOLEES AU LABORATOIRE  
RODOLPHE MERIEUX**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 28/06/2018 devant la

Faculté de Pharmacie

Par Mme DJOMBERA Zainabe

Pour Obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie

(DIPLÔME D'ETAT)

**JURY**

Président : Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Pr Soungalo DAO

Dr Lassina Gadi TIMBINE

Codirecteur : Dr Ibrehima GUINDO

Directeur de thèse : Pr Souleymane DIALLO

## **DEDICACES**

### **Je dédie cette thèse :**

A **ALLAH**, le Tout Puissant, créateur des cieux et de la terre pour m'avoir donné la vie, la santé et l'opportunité de réaliser ce travail. Merci. Veuillez m'accorder le privilège de vous connaître et de vous servir. Puisse votre lumière guider mes pas.

A son Prophète **Mohamed (PSL)** sa famille et ses fidèles compagnons.

### **A mon père Idriss DJOMBERA**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que tu as consentis pour mon instruction et mon bien être. Tu as fait de moi ce que je suis aujourd'hui, je te dois tout, l'excellente éducation, le bien-être matériel, moral et spirituel. Tu es pour moi l'exemple d'abnégation, de dévouement et de probité. Que ce modeste travail soit l'exaucement de tes vœux tant formulés, le fruit de tes innombrables sacrifices, bien que je ne t'en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne te déçoive.

### **A ma mère Djounoubou DJOMBERA**

Ma tendre Maman, tu as consenti d'énormes sacrifices pour nous assurer à nous tes enfants, une meilleure éducation. Tu nous as élevés dans la plus grande affection. Tu es pour moi la mère que tout enfant aimerait avoir, tu as toujours été à l'écoute quand j'avais besoin de toi, m'encourageant et me soutenant dans tes prières bienveillantes. Tu resteras toujours pour nous un modèle pour la vie. Trouve ici la récompense de tes immenses sacrifices et la consolidation de tes profondes angoisses. Que DIEU le Tout Puissant te garde à nos côtés.

### **A ma tante Nayité DRAME**

C'est aussi le vôtre ce travail. A aucun moment je n'ai manqué de vos soutiens et de vos conseils. Que Dieu vous préserve plus longtemps à nos côtés. Recevez ici toute ma modestie et mon attachement indéfectible.

**A mon époux : Aboubacar DABO**

Le mariage est basé sur le soutien mutuel des uns des autres. Si j'ai pu faire ce travail c'est parce que tu as été là pour moi ; me soutenir dans toutes mes actions. Ta patience est irréprochable. Je prie Dieu pour que cette patience perdure et que ton soutien soit toujours effectif.

**-A mes ainé(e)s frères et sœurs :** Vous avez été là, à tout moment et vous avez assuré votre rôle d'aîné, de responsabilité, de votre sens du pardon, de confident, de votre courage .Vous avez été un exemple pour moi et vous m'avez guidée vers le bon chemin. Que Dieu dans sa bonté consolide nos liens d'amour, et d'unité familiale. Amen !!!

**-A ma sœur cadette Naye DJOMBERA**

**-A mes neveux Ibrahim DJOMBERA et Abdallah SACKO**

**-A mes Petit(e)s frères et sœurs :** Ce travail est le vôtre.

**-A notre grande famille DJOMBERA**

**-A ma belle- famille DABO**

Merci pour votre soutien et votre encouragement qui n'ont jamais fait défaut.

**- A mes Oncles et Tantes**

Vos bénédictions, vos conseils et vos encouragements m'ont fortement soutenu tout au long de ce travail.

**- A mes cousines et cousins :**

Trouvez ici ma grande affection et mon sincère remerciement.

**A tous mes amis :** du lycée(LPK) et de la faculté de pharmacie (FAPH).Plus que l'amitié, c'est de la fraternité qui nous unit actuellement. Ensemble, nous avons vécu des moments de galère et de joie. Sachez que je vous aime beaucoup et je n'ai pas de mots pour vous remercier. Que Dieu nous aide à consolider notre amitié.

**A Mes amis, Aminata souley HAROUNA, Samira Hassan, Salimata DEMBELE, Ibrahim OUMAROU, Kadidia TRAORE, Aissétou CISSE et Mariam COULIBALY.**

Nous avons passé les dures moments de la vie universitaire ensemble, ce travail est aussi le vôtre.

**A ma promotion**

Année pour année, nous voilà au terme de notre cursus universitaire je vous souhaite le meilleur qui puisse être.

## **REMERCIEMENTS**

J'ai aujourd'hui l'opportunité de pouvoir exprimer mes réels sentiments, et adresser mes sincères remerciements :

A tout le personnel du Laboratoire Rodolphe Mérieux particulièrement la paillasse de la bactériologie (**Nana Kadidia KEITA, OUEDRAOGO Judicael et Issa SOUMARE**)

Merci pour votre soutien.

Un remerciement particulier va à l'endroit de **Dr COULIBALY Moussa Almamy** pour votre disponibilité, vos conseils et vos contributions qui m'ont permis de venir à bout de ce travail ainsi qu'à tout le personnel de la Pharmacie **M'PEWO**.

Aux Docteurs **NIANGALY, DOUMBIA et TRAORE**.

En témoignage de mes sincères remerciements pour votre contribution à ce document.

Qu'Allah, vous garde longtemps auprès de nous !

### **A mes collègues thésards**

Merci à vous tous pour la qualité de vos collaborations, et de vos soutiens moraux.

Trouvez ici chers collègues l'expression de mes profonds respects et de mes remerciements sincères, ce travail est le vôtre.

**Mes cadets** : Le chemin est long mais avec courage et patience rien n'est impossible.

Soyez patients et courageux.

-A toute la promotion <<Pr N'golo DIARRA>> de la FAPH.

En souvenir des bons moments passés ensemble.

-**A tous mes Enseignants** depuis l'école fondamentale jusqu'à la FAPH.

-**A tous ceux qui de près ou de loin ont participé d'une manière ou d'une autre à ma formation et à l'élaboration de ce travail je vous suis reconnaissant pour votre apport inestimable.**

## **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre maitre et président du jury**

**Professeur agrégé Flabou BOUGOUDOGO**

- **Pharmacien Microbiologiste,**
- **Maître de Conférences Agrégé en Bactériologie, Virologie,**
- **Responsable de l'enseignement de Bactériologie - Virologie à la Faculté de Pharmacie,**
- **Ancien Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP),**
- **Chevalier de l'ordre du Mérite de la Santé.**

**Honorable maître,**

Vous nous faites un grand honneur et un réel plaisir en acceptant de présider ce Jury malgré vos multiples occupations.

Votre amour pour le travail bien fait et vos qualités d'homme de science ont attiré toute notre attention. Votre abord facile, votre simplicité, votre gentillesse et votre franchise, font de vous un praticien admiré et respecté.

Veillez cher Maitre, recevoir ici l'expression de nos sincères remerciements.

**A notre maître et juge**

**Professeur Soukalo DAO**

- **Professeur titulaire de Maladies Infectieuses et tropicales ;**
- **Chef de DER en médecine à la FMOS ;**
- **Responsable de l'enseignement des Maladies Infectieuses à la FMOS ;**
- **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).**

**Cher maître,**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de juger ce travail.

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations, prouve votre générosité et votre modestie. Vos critiques, vos suggestions et vos encouragements ont été d'un apport capital pour l'amélioration de la qualité de ce travail.

Trouvez ici Cher maître, l'expression de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect. Que Dieu le tout puissant vous accorde sa grâce, longévité, paix et Santé. AMEN

**A notre maitre et juge**

**Docteur Lassina Gadi Timbiné**

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

**Cher maître,**

Nous avons été très honorés quand vous avez accepté de façon spontanée d'améliorer et de juger ce travail.

Votre sympathie, votre courtoisie, vos qualités sociales, scientifiques et pédagogiques nous ont beaucoup fascinées et font de vous un maître respecté et convoité par tous.

Veillez recevoir ici, cher maître le témoignage de notre profonde gratitude et notre entière satisfaction.



**A Notre Maître et Co-directeur**

**Docteur Ibrehima GUINDO**

- **Pharmacien biologiste ;**
- **Chef de service Bactériologie-Virologie à l'INRSP**
- **Maitre-assistant de Bactériologie Virologie à la Faculté de Pharmacie de Bamako.**

**Cher maître,**

Ce travail est sans doute le fruit de vos efforts.

Votre rigueur scientifique, votre esprit d'ouverture et votre amour pour le travail bien fait font de vous un exemple à suivre. Soyez rassuré que vos nombreux conseils et enseignements ne seront pas vains et nous sommes très fiers d'être parmi vos élèves.

Nous garderons de vous l'image d'un homme de science et d'un enseignant soucieux de la formation de ses élèves.

Soyez en remercié du fond du cœur et recevez cher maître nos sentiments de reconnaissance, de respect et de profonde sympathie. Que Dieu le tout puissant vous accorde longue vie et Santé. AMEN

**A notre Maître et Directeur de thèse,**

**Professeur Souleymane DIALLO II**

- **Pharmacien biologiste,**
- **Maître de Conférences de Bactériologie-Virologie à la Faculté de Pharmacie,**
- **Colonel Major des services de santé des armées,**
- **Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako.**

**Cher maître,**

Vous nous avez fait un grand honneur en acceptant de diriger ce travail malgré vos multiples et importantes occupations. Votre disponibilité, votre rigueur scientifique, votre abord facile, votre simplicité, vos éminentes qualités humaines de courtoisie, de sympathie, votre dévouement pour la formation de vos étudiants, votre amour pour le travail bien fait, vos qualités d'homme de science et de culture font de vous un exemple à suivre. Cher maître veuillez accepter, l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

## LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

AKN: amikacine

AMC: amoxicilline+ acide clavulanique

AMX: amoxicilline

BGN: Bacille Gram Négatif

BLSE : Bêta-lactamases à Spectre Elargi

BPO : Bactérie Pathogène Opportuniste

BPS : Bactérie Pathogène Spécifique

C1G : céphalosporine de Première Génération

C2G : céphalosporine de Deuxième Génération

C3G : céphalosporine de Troisième Génération

C4G : céphalosporine de Quatrième Génération

CAZ: ceftazidime

CEF: cefalotine

CICM : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux

CIP: ciprofloxacine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COS : Columbia +5% de sang frais de mouton

CTX: cefotaxime

DNA ou ADN: Acide Désoxyribonucléique

G+C : Guanine + Cytosine

FOX: cefoxitine

GEN: gentamicine

H<sub>2</sub>S: Hydrogène Sulfureux

IMI: imipénème

IVI : infections des voies urinaires

L-palDA : Phényl Alanine Désaminase

LPS: Lipo-polysaccharides

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

MSA : Mannitol-Salt-Agar

NAL: Acide nalidixique

NNIS : National Nosocomial

Infections Surveillance

NO<sub>3</sub>: Nitrate

NOR: norfloxacin

ODC: Ornithine Décarboxylase

OFL : ofloxacin

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONPG: Ortho-nitro-phényl-galacto-pyranoside

PEF: pefloxacin

PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines

PVX : Poly-vitex

TDA : Activité Tryptophane Désaminase

TIC: ticarcilline

TOB: tobramycine

TSU/ SXT: cotrimoxazole

TZP: pipéracilline + tazobactam

UTI : Urinary Tract- Infection

## SOMMAIRE

1. Introduction .....	17
1.1. Objectifs .....	18
1.1.1 Objectif général : .....	18
1.1.2 Objectifs spécifiques : .....	18
2. Généralités.....	19
2.1. Rappel sur les entérobactéries.....	19
2.1.1 Définition et classification.....	19
2.1.2Habitat.....	20
2.1.3. Caractères bactériologiques .....	21
2.1.5 Pouvoir pathogène naturel .....	22
2.1.6 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques .....	23
2.1.7 Conservation des souches .....	30
2.2Résistance aux antimicrobiens des souches du genre <i>Proteus</i> .....	33
2.2.1 Historique et définition .....	33
2.2.2Taxonomie .....	33
2.2.3 Caractères bactériologiques de <i>Proteus</i> .....	34
2.2.4 Pouvoir pathogène et Habitat.....	36
2.2.5 Sensibilité aux antibiotiques .....	37
3. Méthodologie .....	39
3.1 Cadre de l'étude .....	39
3.2 Type d'étude .....	40
3.3 Période d'étude .....	40
3.4 Population d'étude .....	40
3.5 Échantillonnage.....	40
3.5.1 Critère d'inclusion .....	40
3.5.2 Critère de non inclusion.....	40
3.6 Collecte des données.....	40
3.7 Variables étudiées .....	40
3.8 Matériels.....	41
3.8.1. Matériels utilisés .....	41
3.8.2. Milieux de culture.....	41
3.9 Antibiotiques testés .....	43
3.10. Examen bactériologique.....	43

3.10.1. Types de prélèvement .....	43
3.10.2. Examen microscopique.....	43
3.10.3. Culture.....	44
3.10.4. Examen macroscopique des cultures .....	44
3.10.5. Identification et antibiogramme.....	44
3.10.6. Contrôle de qualité.....	44
3.11. Analyse et traitement des données .....	44
3.12. Aspects bioethiques .....	44
3.13. Diagramme de Gantt.....	44
5. Commentaires et discussion.....	57
6. Conclusion.....	62
7. Recommandations .....	62
Références .....	63

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I: Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (10) .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau II : Caractères différentiels de la tribu des Proteae (22).....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau III : Diagramme de Gantt .....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau IV : Répartition des entérobactéries parmi les BGN.....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau V: Fréquence des entérobactéries isolées au LRM .....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau VI: Répartition des souches selon le type de prélèvement .....</b>	<b>50</b>
<b>Tableau VII : Répartition des souches de <i>Proteus</i> selon les produits pathologiques ..</b>	<b>50</b>
<b>Tableau VIII : Répartition du niveau de résistance des souches de <i>Proteus</i> aux antibiotiques.....</b>	<b>53</b>
<b>Tableau IX : Profil de résistance des bactéries aux bêta-lactamines .....</b>	<b>55</b>
<b>Tableau X : Répartition de <i>Proteus mirabilis</i> selon les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines .....</b>	<b>56</b>
<b>Tableau XI : Profil de résistance de <i>Proteus</i> aux autres antibiotiques .....</b>	<b>56</b>

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1 : <i>Proteus</i> vues au microscope (microscope électronique et microscope optique).....</b>	<b>34</b>
<b>Figure 2 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Proteus mirabilis</i> sur gélose Uriselect 4. Photo du LRM.....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 3 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Proteus mirabilis</i> sur gélose Drigalski. Photo du LRM. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figure 4 : Répartition des patients selon leur provenance.....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 5 : Fréquence d'isolement des <i>Proteus</i> selon la période .....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 6 : Répartition des souches selon les espèces isolées.....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 7 : Répartition des échantillons selon le sexe .....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 8 : Répartition des échantillons selon la tranche d'âge.....</b>	<b>52</b>



## 1. Introduction

La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des bêtalactamases à spectre élargi (BLSE) qui se disséminent notamment en milieu communautaire (1).

Cette émergence et cette dissémination constituent une menace majeure pour la santé publique. La résistance est particulièrement inquiétante surtout les souches sécrétrices des BLSE chez les entérobactéries avec des taux de 10 à 100 % et de 30 à 50 % respectivement pour la colonisation et les processus infectieux (2).

Un premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques a dressé un tableau très complet de la résistance actuelle aux antibiotiques à travers les données provenant de 114 pays. Ce rapport a fait état de la présence d'une résistance aux antibiotiques dans toutes les régions du monde et a accordé une grande priorité à la lutte contre l'antibiorésistance. 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 (3).

Il existe peu de données évaluant l'impact des différents facteurs sur le niveau de résistance antimicrobienne observé à l'heure actuelle dans les pays en développement et en particulier en Afrique de l'Ouest (4).

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse.

Les bactéries du genre *Proteus* se classent au troisième rang parmi les causes de ces infections, en particulier en milieu hospitalier (5).

*P. mirabilis* est souvent trouvé en tant qu'organismes libres vivant souvent dans le sol, l'eau et le tractus intestinal de nombreux mammifères, y compris les humains. *P. mirabilis* est la troisième cause la plus fréquente (après *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*) d'infections urinaires compliquées (causant 12% des infections) et la deuxième cause la plus fréquente (après *Providencia stuartii*) de bactériémie associée aux cathéters dans le groupe des infections à long terme des patients cathétérisés (causant 15% des infections) (6).

Bien que *P. mirabilis* ne soit généralement pas une cause fréquente d'infection urinaire chez les personnes immunocompétentes, il s'agit d'un agent pathogène important chez les patients présentant des affections urinaires compliquées, une lithiase urinaire ou un cathétérisme à long terme. *P. mirabilis* était sensible aux céphalosporines et aux inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase. Cependant, des souches résistantes aux  $\beta$ -lactamines médiées par les  $\beta$ -lactamases acquises sont apparues dans les années 1990, une première souche productrice de BLSE a été découverte en 1987 (7).

Au Mali peu de données actualisées permettent de définir l'ampleur de ce phénomène tant au niveau hospitalier que communautaire. C'est dans ce contexte général que nous avons été amenés à entreprendre le présent travail.

## **1.1. Objectifs**

### **1.1.1 Objectif général :**

Évaluer le niveau de résistance aux antibiotiques des souches de *Proteus* spp isolées au LRM du CICM de janvier 2015 à décembre 2017.

### **1.1.2 Objectifs spécifiques :**

- Déterminer la fréquence d'isolement des souches de *Proteus* aux CICM;
- Déterminer le profil de résistance des souches de *Proteus* aux bêta-lactamines ;
- Déterminer les phénotypes résistants aux bêta-lactamines ;
- Déterminer le niveau de résistance aux autres classes d'antibiotiques.

## 2. Généralités

### 2.1. Rappel sur les entérobactéries

#### 2.1.1 Définition et classification

La famille des Enterobacteriaceae est constituée de genres bactériens qui sont rassemblés en raison de 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 mol % (8).

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*  
(9).

**Tableau I: Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (10)**

<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>	<i>Shigella boydii</i> (groupe C)
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>subsp. 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</i>	<i>Proteus penneri</i>	€ <i>subsp. enterocolitica</i>
<i>gergoviae</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Yersinia intermedia</i>
<i>Enterobacter sakazakii</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Salmonella, tous les sérotypes	
<i>Enterobacter (cancerogenous) taylorae</i>		
<i>Escherichia coli</i>		

### 2.1.2 Habitat

Le nom 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 (10).

### **2.1.3. Caractères bactériologiques**

#### **2.1.3.1 Caractères cultureux**

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 à la sortie de l'organisme.

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4 mm 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 Klebsielles. Leur diamètre peut dépasser 10 mm ; 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 (8).

#### **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 (8).

### 2.1.5 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 (10).

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 (12).

### **2.1.6 Sensibilité 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 (12).

#### **2.1.6.1 Sensibilité 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 « sauvage » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréidopénicillines, à l'aztréonam, aux cephalosporines 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, uréidopénicillines, 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 CIG.

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 uréidopénicillines. 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 ou 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 : *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola***

*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*, cette dernière 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 uréïdopénicillines 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 des céphamycines. La résistance aux uréïdopénicillines 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 (12).

- **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 »**

**Phénotype**

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 uréïdopénicillines 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 uréïdopénicillines 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 »**

### **Phénotype**

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 uréïdopénicillines, 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).

### 2.1.6.2 Sensibilité 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 gènes 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.

### 2.1.6.3 Sensibilité aux quinolones

Les entérobactéries sont **sensibles aux quinolones classiques** (acide nalidixique, acide pipemidique etc.) et aux **fluoroquinolones** (péfloxacine, ofloxacine, 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.

### 2.1.6.4 Sensibilité aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à gram négatifs

Les entérobactéries habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines sont habituellement sensibles aux phenicoles, 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 (10).

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 (13).

### **2.1.7 Conservation des souches**

Tout bactériologiste est confronté à la conservation des souches bactériennes. Les motifs de conservation sont variés, parmi lesquels :

- 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 évidences 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.

### **2.1.7.1 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 entraîner 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 des 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.

### **2.7.1.2 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 (14).



## **2.2 Résistance aux antimicrobiens des souches du genre *Proteus***

### **2.2.1 Historique et définition**

Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles très polymorphes (d'où la référence à Protée) (8).

C'est en 1885 que Hauser décida par analogie au Dieu grec Proteus de retenir ce nom afin de dénommer une bactérie insaisissable et qui change de forme, personnifié dans les poèmes homériques de Proteus (15,16). Ce sont des entérobactéries opportunistes car à l'occasion d'un affaiblissement des défenses immunitaires ou de techniques de soins, de réanimation particulièrement, ces bactéries peuvent coloniser différents sites anatomiques et y développer une infection. Il s'agit des bactéries uréase-positives capables d'essaimage lorsqu'elles sont cultivées en milieu solide. Dans une culture jeune il peut exister des formes courtes et des formes longues. Les souches très mobiles sont pourvues de longs flagelles aéro-anaérobies. Elles font partie de la flore gastro-intestinale normale de l'humain (17).

### **2.2.2 Taxonomie**

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales

Famille : Enterobacteriaceae

Genres: *Proteus*

Espèces : *Proteus vulgaris*, *Proteus hauseri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus rettgeri*, *Proteus myxofaciens*.

Cependant les études par homologie des ADN ont permis de classer le genre *Proteus* en 4 espèces dénommées *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. myxofaciens* et *P. penneri* et 4 espèces génomiques appartenant auparavant au biogroupe 3 de *P. vulgaris*. Les souches de *P. vulgaris* appartenaient classiquement aux trois biogroupe suivant :

- biogroupe 1 : négatif pour indole, salicine et esculine ; résistance au chloramphenicol ;
- biogroupe 2 : positif pour indole, salicine et esculine ;

- biogroupe 3 : positif pour indole, négatif pour salicine et esculine.

Du fait des modifications taxonomiques, *Proteus* biogroupe 1 constitue une espèce propre, *P. penneri*

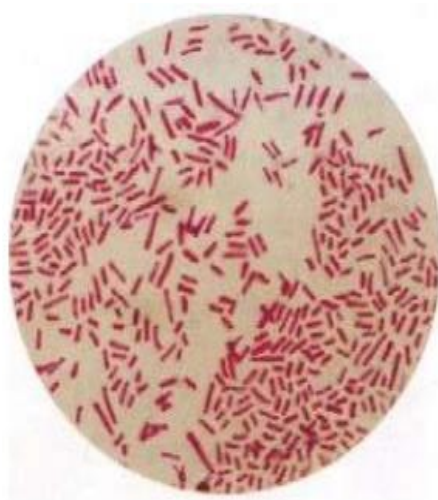
Ce genre rassemble des espèces TDA, L-palDa , gélatinase , H<sub>2</sub>S et uréase positive, ne fermentant pas le mannose (18).

### 2.2.3 Caractères bactériologiques de *Proteus*

#### 2.2.3.1 Caractères morphologiques

Bacilles en forme de bâtonnet , elles mesurent habituellement 0,3 à 1,0 µm de large par 0,6 à 6,0 µm de long: ils sont activement mobiles, non sporulés, non-capsulés (19).

Les espèces du genre *Proteus* produisent des cellules de forme allongées abondamment couvertes de flagelles agissant de concert pour produire une motilité croissante sur les milieux solides (20).



**Figure 1 : *Proteus* vues au microscope (microscope électronique et microscope optique)**

#### 2.2.3.2 Caractères biochimiques

Les *Proteus* sont caractérisées par leur uréase très active, la production de H<sub>2</sub>S, d'une gélatinase et leur pouvoir glucidolytique faible (8).

**Tableau II : Caractères différentiels de la tribu des Proteae (22)**

	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. penneri</i>
Uréase	+	+	+
Indole	-	+	-
H <sub>2</sub> S	+	+	D
Citrate de Simmons	D	D	-
Gaz en glucose	+	+	+
Mannitol	-	-	-
Adonitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Tréhalose	+	D	D
ODC	+	-	-
Gélatinase	+	+	D

H<sub>2</sub>S : hydrogène sulfureux

D : variable

ODC : ornithine décarboxylase

### 2.2.3.3 Culture et identification :

Les *Proteus* ne sont pas des bactéries exigeantes. Elles poussent bien sur des milieux ordinaires tels que les géloses BCP, Drigalski, Mac Conkey et autres. Les colonies diffusent sur les milieux riches et donnent un aspect en nappe. Ces bactéries présentent une odeur désagréable caractéristique.

Elles sont facilement reconnues par leur caractère très particulier d'envahissement formant des vagues concentriques à partir du point d'ensemencement «swarming » 85 à 100 % des souches de *P. mirabilis* et de *P. vulgaris* et 65 % de celles de *P. penneri* (18).

Au laboratoire de routine, la méthode cependant la plus simple pour limiter le «swarming» des *Proteus* consiste à repiquer la culture sur milieu SS ; les colonies autres que *Proteus* pourront apparaître ainsi non recouvertes et donc disponibles (18),

des milieux déficients en électrolytes comme le milieu CLED (diminution de la teneur en NaCl) peuvent aussi être utilisés pour empêcher ce phénomène (21).

Quelques tests simples (Indole, ODC et production acide à partir du maltose) permettent de séparer les principales espèces de *Proteus* d'intérêt clinique. De plus, la sensibilité au chloramphénicol peut constituer un test utile : *P. penneri* est résistant au chloramphénicol alors que *P. mirabilis* et *P. vulgaris* biogroupe 3 sont sensibles. Les résultats obtenus avec *P. vulgaris* biogroupe 3 sont sensibles, les résultats obtenus avec *P. vulgaris* biogroupe 2 sont variables (22).

#### **2.2.4 Pouvoir pathogène et Habitat**

Les bacilles du genre *Proteus* font partie de la flore intestinale normale de l'humain et sont aussi ubiquistes dans l'environnement ; on les retrouve entre autres chez les animaux de même que dans le sol et l'eau polluée (19). En milieu hospitalier ces bactéries colonisent la peau et la muqueuse buccale des patients et du personnel hospitalier bien qu'elles ne soient pas une cause commune d'infections nosocomiales(23,24).

*P. mirabilis* est une bactérie souvent impliquée dans des infections à l'hôpital puisqu'elle représente 4% de toutes les infections rapportées par le NNIS américain ; les infections urinaires représentant la cause la plus fréquente.

*P. mirabilis* (90% de proteusinfections) et *P. mirabilis* est la troisième cause plus fréquente (après *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae*) d'une UTI compliquée (causant 12% des infections) (25,26). Les *Proteus* en général constituent des bactéries uropathogènes majeures. *P. mirabilis* serait l'espèce bactérienne la plus souvent impliquée après *E. coli* dans les infections urinaires. Les bactériuries à *P. mirabilis* seraient de deux types distincts.

Le premier correspond à des infections urinaires non compliquées du tractus urinaire chez les femmes jeunes. Les patients présentent des signes typiques de cystite avec pyurie, dysurie, douleurs sus-pubiennes et quelquefois hématurie.

Le second groupe apparait chez des patients prédisposés présentant des altérations structurales, physiologiques ou neurologiques impliquées dans le bon fonctionnement du tractus urinaire (19,27).

Le caractère le plus commun à toutes ces infections est le cathétérisme urinaire qui lorsqu'il est poursuivi sur le long terme (30 jours) pourra avoir comme conséquence une septicémie associée.

Les méningites particulièrement en pédiatrie, font partie des complications les plus redoutables des infections à *P. mirabilis*.

*P. mirabilis* est un organisme modèle pour les uropathogènes producteurs d'uréase. Ces diverses bactéries causent des pierres d'infection dans les voies urinaires et forment des biofilms cristallins sur des cathéters urinaires permanents, conduisant souvent à une infection polymicrobienne (22).

Ces bactéries sont aussi retrouvées dans les échantillons de pus chez les patients présentant le pied diabétiques (27).

Elles sont également responsables d'infections diverses : surinfections des plaies, infections cutanées, infections de l'oreille, du tractus respiratoire et plus rarement de septicémies et d'atteinte articulaire (28).

*Proteus vulgaris* est le plus souvent isolé chez des patients immunodéprimés ou ceux sur un régime antibiotique à long terme (29).

### **2.2.5 Sensibilité aux antibiotiques**

Les *Proteus* ont une résistance naturelle aux polymyxines et aux tétracyclines.

*P. mirabilis* demeure sensible aux bêtalactamines contrairement aux autres *Proteus* (2).

Les *Proteus* indole négatives (*Proteus mirabilis*) sont en général plus sensibles aux antibiotiques que les espèces indole positives (*Proteus vulgaris*).

Les souches de *P. mirabilis* sont résistantes à la nitrofurantoïne mais sont sensibles au triméthoprime-sulfaméthoxazole, à l'ampicilline, à l'amoxicilline, à la piperacilline, aux céphalosporines, aux aminoglycosides et à l'imipénème. Bien que la plupart des souches soit sensible à la ciprofloxacine, la résistance se produit avec l'utilisation illimitée du médicament (20).

L'exception est constituée par les souches indole négatives de *P. penneri* (*P. vulgaris* biogroupe 1) qui se comportent comme des *Proteus* indole-positifs en terme de résistance puisque présentant une plus grande résistance à de nombreux agents antimicrobiens (18). *P. penneri* et *P. vulgaris* ont des profils de résistance similaires à ceux de *Morganella*, bien que *P. penneri* soit plus résistant à la pénicilline que *P. vulgaris*.

Les trois organismes sont sensibles aux céphalosporines à large spectre, à la cefoxitine, au céfepime, à l'aztreonam, aux aminoglycosides et à l'imipénème. Ils sont résistants à la piperacilline, à l'amoxicilline, à l'ampicilline, à la cefoperazone, à la cefuroxime et à la cefazoline (20).

Les *Proteus* et *Providencia* sont parmi les germes les plus résistants aux antibiotiques et certaines souches sont devenues « résistantes à tout ». Le traitement doit être guidé par l'antibiogramme (2).

### **3. Méthodologie**

#### **3.1 Cadre de l'étude**

Notre étude a été réalisée au Laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux.

Le CICM 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 diplomate 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.

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).

Source : Docteur ISSABRE Youssouf

### **3.2 Type d'étude**

Notre étude a été transversale, rétro-prospective.

### **3.3 Période d'étude**

L'étude s'est déroulée sur une période de 3 ans allant de janvier 2015 à décembre 2016 (étude rétrospective) et de janvier à décembre 2017 (étude prospective).

### **3.4 Population d'étude**

L'étude s'est portée sur 56 souches de *Proteus* isolées à partir des prélèvements de pus et d'urines au CICM.

### **3.5 Échantillonnage**

#### **3.5.1 Critère d'inclusion**

Ont été inclus dans notre étude toutes les souches d'entérobactéries du genre *Proteus* isolées et dont l'antibiogramme a été réalisé au LRM dans la période ci-dessus indiquée.

#### **3.5.2 Critère de non inclusion**

N'ont pas été inclus dans notre étude toutes les souches d'entérobactéries n'appartenant pas au genre *Proteus*, toutes les souches de *Proteus* dont l'antibiogramme n'a pas été réalisé et les souches de *Proteus* isolées en dehors de la période d'étude.

### **3.6 Collecte des données**

Les données ont été recueillies à partir des dossiers des patients comportant entre autres le numéro d'identification du patient, le sexe, l'âge, le type de prélèvement, la structure de santé de provenance de la demande d'examen, l'espèce bactérienne isolée et l'antibiogramme.

### **3.7 Variables étudiées**

– le germe,



- l'âge du patient,
- le sexe,
- le type de prélèvement,
- le profil de résistance aux antibiotiques testés,
- la provenance.

### **3.8 Matériels**

#### **3.8.1. Matériels utilisés**

Automate (mini API - VITEK<sup>®</sup> 2 Compact) ;

Densitomètre ;

Vortex ;

Cassette VITEK<sup>®</sup> 2

Consommables :

Oeses ;

Cartes VITEK<sup>®</sup> 2 Compact ;

Tube sec ;

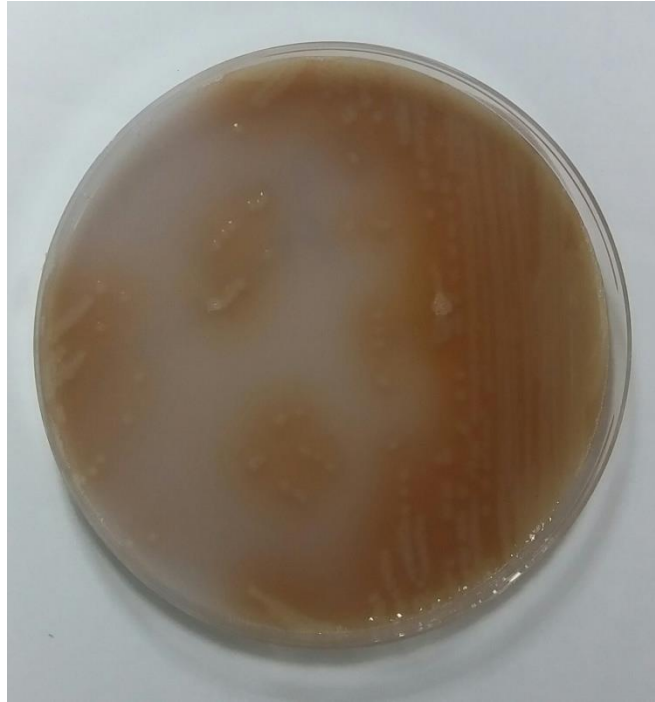
Bec benzène.

#### **3.8.2. Milieux de culture**

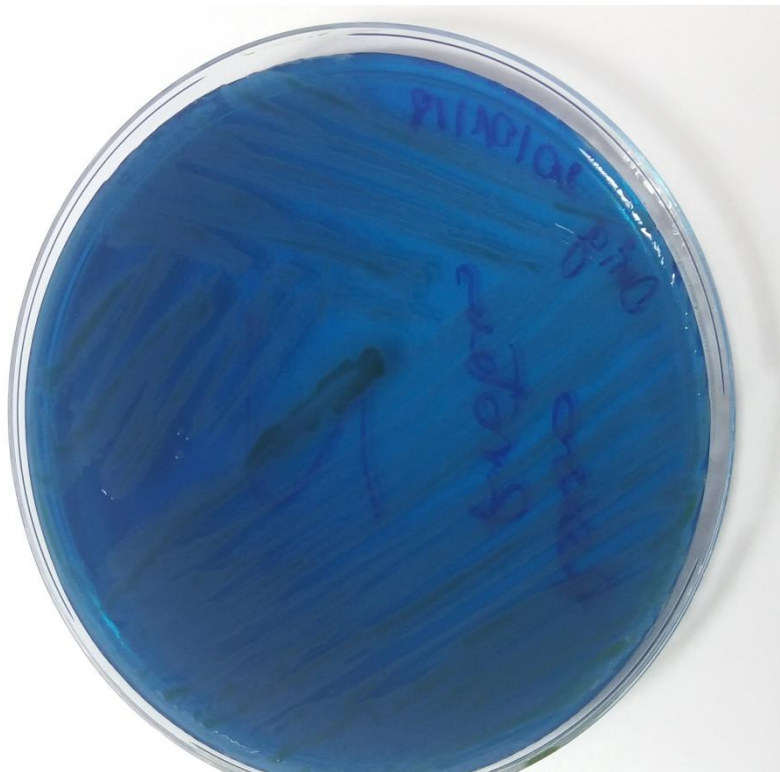
Gélose uriselect 4

Gélose Drigalski

Gélose Mueller- Hinton



**Figure 2 : Aspect macroscopique des colonies de *Proteus mirabilis* sur gélose Uriselect 4. Photo du LRM.**



**Figure 3 : Aspect macroscopique des colonies de *Proteus mirabilis* sur gélose Drigalski. Photo du LRM.**

### **3.9 Antibiotiques testés**

Selon l'EUCAST- SFM la liste standard des antibiotiques testés chez les entérobactéries comporte 25 antibiotiques de différentes familles.

Dans notre cas seuls 16 antibiotiques ont été testés de la famille des Bêtalactamines, Quinolones, Aminosides et Sulfamides.

Bêtalactamines :

Aminopénicillines (AMX 25µg)

Carboxypénicillines (TIC 75µg)

Aminopénicillines +IBL (AMC 20 µg, TZP 75/10µg)

Céphalosporines : (CEF 30µg, FOX 30µg, CAZ 30µg, CTX 30µg)

Carbapénèmes: (IMI 10µg)

Aminosides: (TOB 10µg, AKN 30µg, GEN 15µg)

Quinolones: (NAL 30µg, CIP/OFL 5µg, NOR/PEF 5µg)

Autres :(SXT 25µg).

Le nombre maximum d'antibiotiques testés était de 16(cas de 7 souches) et le minimum était de 7(cas d'une seule souche).

7 souches ont été testées par 16 ATB.

11 souches ont été testées par 15 ATB.

14 souches ont été testées par 14 ATB.

13 souches ont été testées par 13 ATB.

5 souches ont été testées par 12 ATB.

2 souches ont été testées par 11 ATB.

3 souches ont été testées par 10 ATB.

1 souche a été testée par 7 ATB.

### **3.10. Examen bactériologique**

#### **3.10.1. Types de prélèvement**

Pus et urines.

#### **3.10.2. Examen microscopique**

Coloration de gram (voir SOP en annexe).

Cette méthode permet d'apprécier la coloration et la morphologie des bactéries.

### **3.10.3. Culture**

La culture est réalisée sur différents milieux puis incubée entre 18 à 24 heures à 37°C.

### **3.10.4. Examen macroscopique des cultures**

Permet d'apprécier l'aspect, la couleur, la forme et l'odeur des colonies.

### **3.10.5. Identification et antibiogramme**

- le mini API (galerie API 20 E) et le VITECK® Compact ont été utilisés.

L'antibiogramme est aussi effectué par la méthode de diffusion en milieu gélosé sur disques selon le CA-SFM version 2017.

### **3.10.6. Contrôle de qualité**

Pour le contrôle de qualité nous avons utilisé la souche de référence *E. coli* ATCC25922.

### **3.11. Analyse et traitement des données**

Les données ont été saisies sur Microsoft Word version 2007 et analysées sur Excel et le logiciel Epi info version 7.

### **3.12. Aspects bioethiques**

L'autorisation des responsables du laboratoire a été obtenue pour l'utilisation des échantillons.

L'anonymat et la confidentialité des patients ont été respectés conformément aux règles d'éthique médicale et à la législation sur la recherche biomédicale et scientifique.

Il n'y a pas de conflit d'intérêt dans cette étude.

Les références bibliographiques n'ont fait l'objet d'aucune modification.

### **3.13. Diagramme de Gantt**

**Tableau III : Diagramme de Gantt**

<b>Périodes Activités</b>	<b>Novembre- Décembre 2016</b>	<b>Décembre 2016- Janvier 2017</b>	<b>Janvier- Décemb re 2017</b>	<b>Janvier- Mai 2018</b>	<b>Mai- Juin 2018</b>	<b>Juin 2018</b>
<b>Revue de la littérature</b>	<b>X</b>					
<b>Elaboration et réalisation du</b>		<b>X</b>				

<b>protocole</b>						
<b>Collecte et analyses des données, rédaction de la thèse</b>			<b>X</b>			
<b>Correction du document</b>					<b>X</b>	
<b>Soutenance</b>						<b>X</b>

## 4. Résultats

Pendant la durée de notre étude de 3 ans, 56 souches de *Proteus* ont été isolées des prélèvements de pus et d'urines au sein du laboratoire Rodolphe Mérieux.

### 4.1. Résultats globaux

Au total 734 BGN ont été identifiées par les méthodes conventionnelles parmi lesquelles 692 entérobactéries soit 94.28%.

#### 4.1.1 Fréquence d'isolement des BGN

**Tableau IV : Répartition des entérobactéries parmi les BGN**

BGN	Effectifs	Pourcentage
Autres	42	5,72
Entérobactéries	692	94,28
Total	734	100

Les entérobactéries sont majoritaires par rapport aux autres bacilles gram négatifs soit 94,28%.

#### 4.1.2. Répartition des entérobactéries isolées au LRM

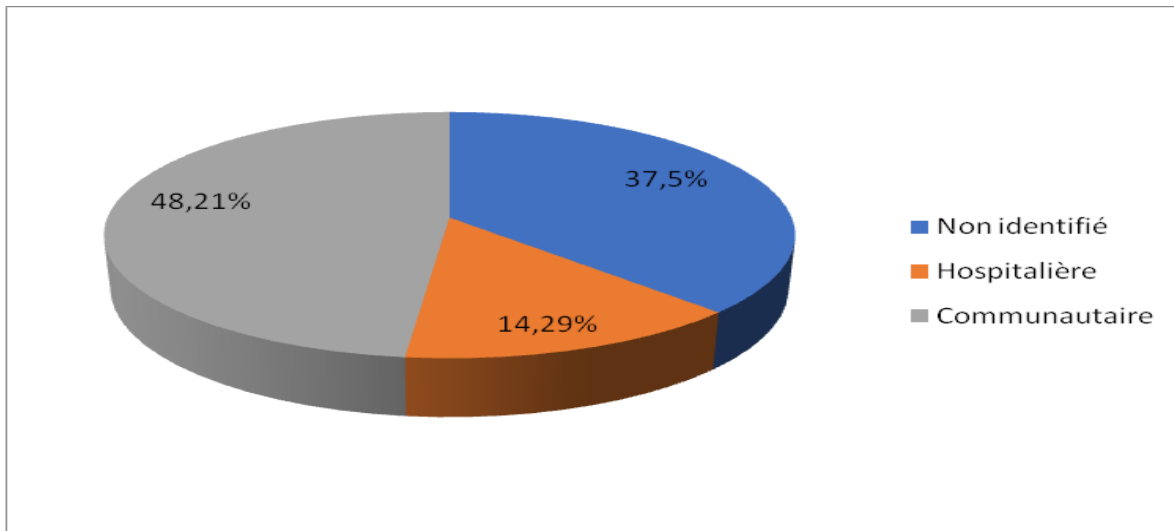
Tableau V: Fréquence des entérobactéries isolées au LRM

Germes	Effectifs	Pourcentage
<i>Citrobacter</i> spp	5	0,72
<i>Enterobacter</i> spp	41	5,92
<i>Escherichia coli</i>	363	52,46
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	132	19,08
<i>Leclercia</i> spp	1	0.14
<i>Morganella</i> spp	15	2,17
<i>Pantoea</i> spp	1	0,14
<b><i>Proteus</i> spp</b>	<b>56</b>	<b>8,09</b>
<i>Providencia</i> spp	11	1,59
<i>Raoultella</i> spp	6	0,88
<i>Salmonella</i> spp	54	7,80
<i>Serratia</i> spp	4	0,58
<i>Shigella</i> spp	3	0,43
TOTAL	<b>692</b>	<b>100</b>

Treize (13) espèces d'entérobactéries ont été isolées au LRM pendant notre période d'étude parmi lesquelles *Proteus* se classe en troisième position après *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

## 4.2. Répartition des patients selon la provenance et l'année

- Répartition selon la provenance (n=56)

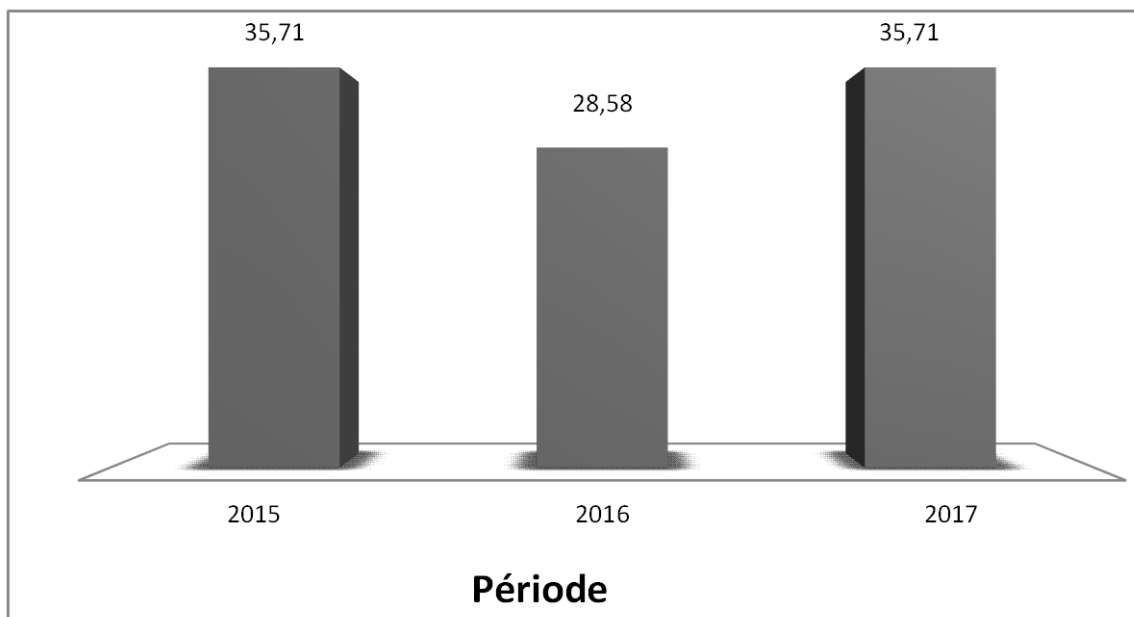


**Figure 4 : Répartition des patients selon leur provenance**

Les souches communautaires représentaient presque la moitié de nos souches (48,21%).

La provenance de plusieurs patients était non identifiée soit 21 cas sur les 56.

- Répartition selon l'année

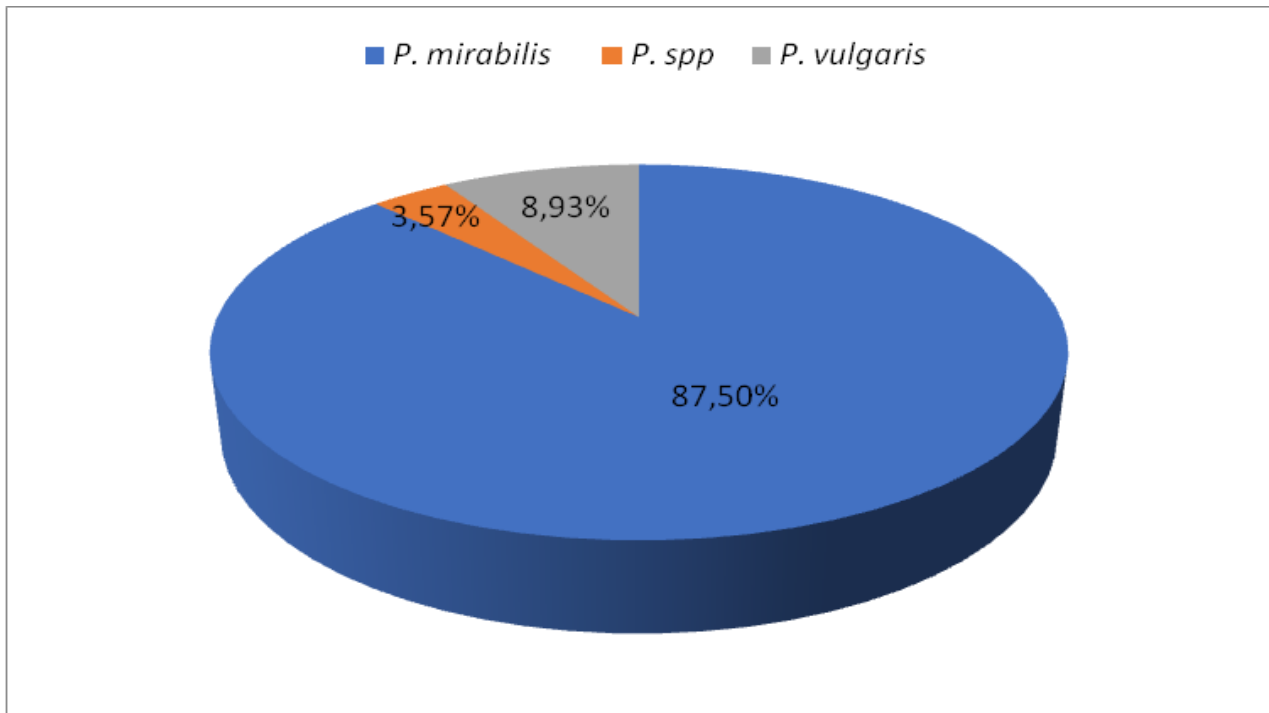


**Figure 5 : Fréquence d'isolement des *Proteus* selon la période**

On constate une décroissance de la fréquence d'isolement en 2016.

## 4.3. Répartition des souches selon l'espèce (n=56)





**Figure 6 : Répartition des souches selon les espèces isolées**

L'espèce *P. mirabilis* était majoritairement représentée avec 87,5%.

#### 4.4. Répartition des souches selon le type de prélèvement, le sexe, l'âge et la tranche d'âge

- Fréquence d'isolement des souches selon le type de prélèvement

**Tableau VI: Répartition des souches selon le type de prélèvement**

Échantillons	Fréquence	Pourcentage
Pus	54	96,43
Urines	2	3,57
<b>Total</b>	56	100

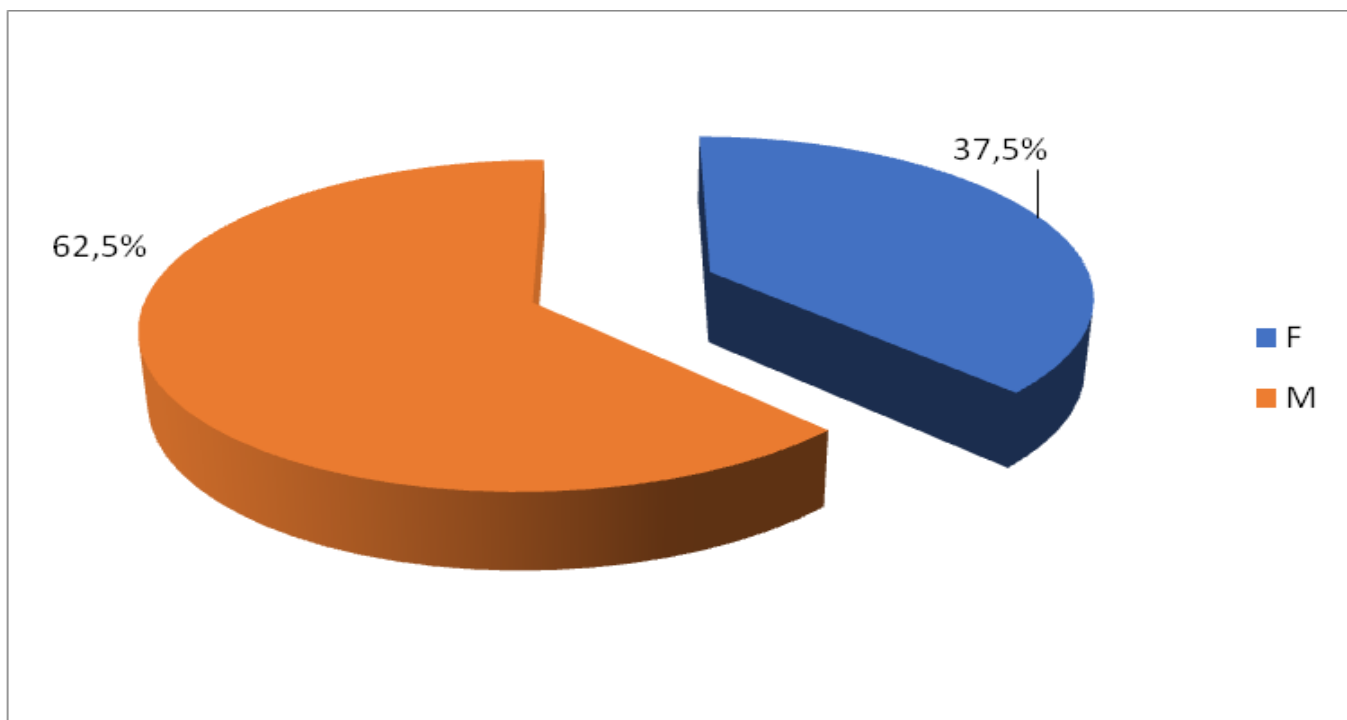
Les bactéries du genre *Proteus* ont été isolées majoritairement dans les prélèvements de pus.

**Tableau VII : Répartition des souches de *Proteus* selon les produits pathologiques**

Type de prélèvements	Proteus	Autres BGN	Total	Fréquence
Pus	54	238	292	18,49
Urines	2	312	314	0,63
<b>Total</b>	56	550	606	9,24

Les *Proteus* représentaient 18,49% des bactéries isolées des prélèvements de pus et 0,63 % des bactéries isolées des prélèvements d'urines.

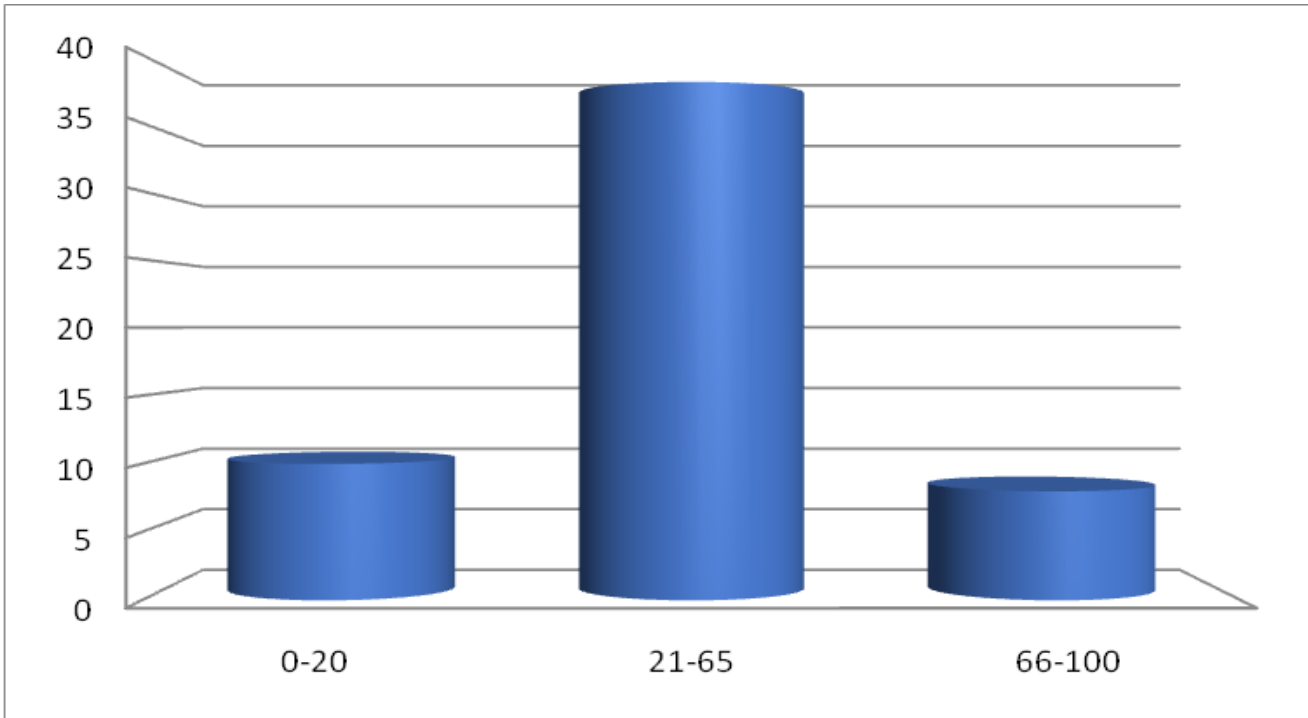
- Répartition des échantillons selon le sexe (n=56)



**Figure 7 : Répartition des échantillons selon le sexe**

On a constaté une prédominance des isolements chez les hommes avec un pourcentage de 62,5%, le sexe ratio était 1,67.

- Répartition des souches selon la tranche d'âge des patients



**Figure 8 : Répartition des échantillons selon la tranche d'âge**

La tranche d'âge de 21-65 a été la plus représentée avec un taux de 67,86%.

#### 4.5. Profil de résistance aux antibiotiques

**Tableau VIII : Répartition du niveau de résistance des souches de *Proteus* aux antibiotiques**

ANTIBIOTIQUES	Souches R	Souches S	Total	Taux de résistance
<b>Bêtalactamines</b>				
AMX	42	13	55	76,36
AMC	37	18	55	67,27
TIC	37	19	56	66,07
TZP	13	23	36	36,11
CEF	20	31	51	39,22
FOX	31	16	47	65,96
CTX	24	25	49	48,98
CAZ	30	26	56	53,57
IMI	00	42	42	00
<b>Aminosides</b>				
GEN	22	24	46	47,83
TOB	21	29	50	42
AKN	11	40	51	21,57
<b>Quinolones</b>				
NAL	35	16	51	68,63
CIP/OFL	22	16	38	57,89
PEF/NOR	11	16	27	40,74
<b>Autres</b>				
SXT	33	15	48	68,75
Total	389	369	758	51,32

AMX : amoxicilline  
acide nalidixique

CTX : cefotaxime

NAL :

AMC : amoxicilline+acide clavulanique

ciprofloxacin ou ofloxacin

TIC : ticarcilline

PEF/NOR: pefloxacin ou norfloxacin

TZP : piperacilline+tazobactam

cotrimoxazole

CEF : cefalotine

FOX : cefoxitine

CAZ : ceftazidime

IMI : imipénème

GEN : gentamicine

TOB : tobramycine

AKN : amikacine

CIP/OFL :

SXT :

La résistance aux bêta-lactamines était de : AMX 76,36%, AMC 67,27% et TIC 66,07%,  
aux quinolones de : 68,63% pour NAL et au SXT 68,75%.

Le taux de résistance global était de l'ordre de 51,32%.

**Tableau IX** : Profil de résistance des bactéries aux bêta-lactamines

ANTIBIOTIQUES	Souches R	Souches S	Total	Taux de résistance
AMX	42	13	55	76,36
AMC	37	18	55	67,27
TIC	37	19	56	66,07
TZP	13	23	36	36,11
CEF	20	31	51	39,22
FOX	31	16	47	65,96
CTX	24	25	49	48,98
CAZ	30	26	56	53,57
IMI	00	42	42	00

Les résistances les plus élevées ont été observées à l'amoxicilline (76,36%), suivies de l'AMC (67,27%) puis la ticarcilline (66,07%), moins élevées à la TZP (36,11%) et la céfalotine (39,22%), aucune résistance à l'imipénème.

**Tableau X : Répartition de *Proteus mirabilis* selon les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines.**

Phénotype	Fréquence	Pourcentage
Sauvage	12	24,49
BMR	37	75,51
<b>TOTAL</b>	<b>49</b>	<b>100</b>

Les BMR ont été les plus représentées avec un taux de 75,51% parmi lesquelles on peut citer les TRI (les plus nombreux), PBN, PHN, CASE et d'autres souches multirésistantes non déterminées.

**Tableau XI : Profil de résistance de *Proteus* aux autres antibiotiques**

Antibiotiques	Résistance	Sensible	Total	Taux de résistance
<b>Aminosides</b>				
GEN	22	24	46	47,83
TOB	21	29	50	42
AKN	11	40	51	21,57
<b>Quinolones</b>				
NAL	35	16	51	68,63
CIP/OFL	22	16	38	57,89
PEF/NOR	11	16	27	40,74
<b>Autres</b>				
SXT	33	15	48	68,75

CIP/OFL= CIP ou OFL

PEF/NOR= PEF ou NOR

Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés contre les quinolones avec un taux de 68,63% (acide nalidixique) et la SXT 68,75%, les aminosides présentaient un taux de résistance de moins de 50%.



## **5. Commentaires et discussion**

Notre travail s'est déroulé au LRM du CICM du 01 janvier 2015 au 31 décembre 2017, c'est une étude transversale rétro-prospective durant laquelle 56 souches de *Proteus* ont été isolées des prélèvements de pus et d'urines.

### **Respect des directives internationales pour le diagnostic des infections à *Proteus* au LRM**

Le LRM dispose de techniciens et biologistes qualifiés qui suivent des formations régulières indispensables à l'amélioration de la qualité des services de laboratoire.

En outre, le LRM utilise des modes opératoires normalisés, des instruments et produits consommables appropriés pour produire des données fiables visant à soutenir la surveillance de la pharmaco-résistance.

Le laboratoire est aussi engagé dans un processus d'évaluation externe de la qualité et d'accréditation.

### **Fréquence d'isolement des *Proteus* parmi les entérobactéries**

Dans notre étude les *Proteus* ont été classés en quatrième position avec un taux de 7,56%.

Les bactéries du genre *Proteus* occupent le sixième rang selon NDIAYE (30).

### **Nature des résultats selon les prélèvements réalisés**

Dans notre étude nous avons observé une prédominance des échantillons de pus avec un taux de 96,43 %, ces prélèvements provenaient en général des patients présentant une plaie diabétique.

Cependant Hamdouche en 2016 en Algérie et Ahmed en Irak en 2015 dans leurs études ont obtenu 60% des souches provenant des prélèvements d'urines (31,32).

### **Fréquence d'isolement selon l'espèce**

*Proteus mirabilis* était l'espèce la plus dominante (87,5%), ces résultats concordent avec ceux obtenus au Nigeria en 2009 par Mordi et Momoh et en Irak en 2015 avec un taux respectif de 64,5% (29) et 66,6% en Irak (32).

*P. mirabilis* est le germe le plus isolé avec 87,5%.

Ces résultats sont confirmés par plusieurs études au cours desquelles *P. mirabilis* reste le germe majoritaire par rapport aux autres espèces du genre (5,29,32,33).

### **Fréquence selon le sexe**

Dans notre étude nous avons observé une prédominance du sexe masculin 62,5% le sexe ratio était de 1,67.

Ce pourcentage élevé pourrait s'expliquer du fait que les hommes sont en général plus exposés aux ulcères du pied et aux amputations et le résultat d'anomalies congénitales observées plus souvent chez les hommes que chez les femmes (21,34).

### **Fréquence selon l'âge**

La tranche d'âge la plus affectée par les infections à *Proteus* se situait entre 21-65 ans avec un pourcentage de 67,86, les âges extrêmes étant de 1 an et 87 ans.

### **Fréquence de l'infection selon les services de santé**

Dans notre étude 48,27% de nos échantillons étaient d'origine communautaire.

Les infections hospitalières étaient faibles soit 14,29%.

Mais en Inde NITA PAL et *al.* ont trouvé un taux de 81,18% des infections hospitalières (33).

LEULMI Zineb en Algérie dans son étude montre une prédominance des souches hospitalières par rapport aux souches communautaires soit un taux de 78,95% (34).

### **Résistance des entérobactéries aux antibiotiques**

#### **Profil de résistance des *Proteus***

Outre la résistance naturelle aux polymyxines, les *Proteus* ont développé une forte résistance vis-à-vis des bêtalactamines, des quinolones et des aminosides.

Les données de la littérature rapportent une tendance générale vers l'augmentation des résistances bactériennes sur les dernières années.

#### **Résistance aux bêtalactamines**

La résistance à l'amoxicilline était de 76,36%, l'association amoxicilline acide clavulanique 67,27%, la ticarcilline 66,07%, l'association piperacilline tazobactam 36,11%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Ahmed en Irak en 2015 (résistance à l'amoxicilline 70%) (32), et par AHANOGBE qui a réalisé une étude sur les échantillons de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 (35).

La résistance aux céphalosporines : cefalotine 39,22%, la cefoxitine 65,96%, la cefotaxime 48,98%, la ceftazidime 53,57%.

Toutes les souches étaient sensibles à l'imipénème. Nos résultats concordent une fois de plus avec les résultats d'Ahmed (32) et ceux obtenus en 2016 par Goudarzi L et *al.* avec une forte résistance aux céphalosporines (26).

HAMDOUCHE CHAIMA au CHU de Constantine a obtenu une résistance élevée à tous les antibiotiques de la famille des bêtalactamines testés (31).

Des études réalisées par Rajiv Ranjan Prasad et *al.* en Inde ont eu comme résultat une résistance élevée aux céphalosporines de troisième génération, mais toutes les espèces de *Proteus* étaient hautement sensibles à la cefotaxime, à la ciprofloxacine, à la lomefloxacine, à la céfopérazone, à la céfuroxime, à l'ofloxacine, à la céfazidime, à la gentamicine, à l'amikacine et la netilmicine (5).

Une étude menée en Juin 2017 au Nigeria par Alabi OS et *al.* a observé une résistance de l'ordre de 1,9% à l'imipénème avec production de BLSE ce qui est contraire à nos résultats (36).

### **Résistance aux autres antibiotiques :**

La majorité des souches exprimaient une résistance élevée aux quinolones avec 68,63% pour l'acide nalidixique, 57,89% pour la ciprofloxacine/ofloxacine et 40,74% pour la pefloxacine/ ofloxacine.

Les aminosides présentaient des résistances de 47,83% à la gentamicine 42% à la tobramycine et 21,57% à l'amikacine.

Aucun antibiotique n'était résistant à 100%.

Le triméthoprime-sulfaméthoxazole présentait une résistance de l'ordre de 68,75%.

- L'université de CHUNGNAM avait fait les mêmes constatations avec 25% de résistance à l'amikacine et nos résultats sont compatibles avec ceux obtenus par AHANOGBE (35).
- Bentroki Aimen A et *al.* (Algérie) ont observé 9% de résistance à la ciprofloxacine et à l'amikacine, 20% à la gentamicine et enfin 45% au cotrimoxazole (37).
- Une étude menée en 2005 en France par l'institut Louis Malarde avait rapporté une grande sensibilité des certains antibiotiques tel que l'amoxicilline, la ticarcilline et la cotrimoxazole, le pourcentage de résistance étant inférieure à 20% (38).
- Une étude réalisée en chine par Chen CM et *al.* a montré une résistance élevée à l'amikacine et à la gentamicine 80% (39).

Ces deux dernières études montrent des résultats très discordants des nôtres.

- DIAKITE en 2010 a observé 66.6% de résistance aux sulfamides (40).

### **Distribution selon les phénotypes de résistance aux bêta-lactamines.**

Parmi les 56 souches de *Proteus* la majorité était des BMR.

*P. mirabilis* par son phénotype sauvage est naturellement sensible à tous les bêta-lactamines excepté les pénicillines du groupe G.

Dans notre cas seul 24,49% des échantillons étaient des souches sauvages. Les 75,51% étaient tous multirésistants sans production de BLSE.

L'étude réalisée au Nigeria par Alabi OS et *al.* a observé 55.6% de souches multirésistantes avec production majoritaire des BLSE.

Selon une étude mené par l'équipe de l'université de l'Aquila en Italie en 2005, 25% des souches étaient des BLSE et elles étaient toutes résistantes à la gentamicine, toutes sensibles à la céfoxitine, aux carbapénèmes et à l'amikacine et parmi lesquelles une majorité était résistante aux fluoroquilonones (41).

Aussi en 2015 à Moscou, dans l'étude de Nadezhda K et *al.* les BMR ont été les bactéries les plus isolées. Il convient de noter qu'une grande partie de ces souches de *P. mirabilis* (54,8%) étaient résistantes à sept classes antibactériennes fonctionnelles et sensibles à seulement trois médicaments, le cefoperazone/sulbactam (100% des isolats),

Ertapénème (100% des isolats) et ceftazidime (87,1% d'isolats) étaient efficaces contre *P. mirabilis* (42).

Au Mali jusqu'à 2005 aucun cas de BLSE n'avait été rapporté, dans l'étude de Roland Achille, sur les 5 souches de *Proteus* aucune n'étaient productrices des bêtalactamases à spectre élargi (43).

Entre 2006 et 2008, Tenoussé a obtenu 3 souches de *Proteus mirabilis* productrices de BLSE soit 7% (44) .

AHANOGBE a observé 2 souches productrices de BLSE en 2014.

## 6. Conclusion

Au terme de notre étude portée sur l'évolution de la résistance aux antibiotiques des souches de *Proteus* au LRM du CICM pendant une durée de 3ans ayant abouti à l'isolement de 56 souches de *Proteus* ; nous avons observé un fort pourcentage de résistance aux différentes classes d'antibiotiques surtout aux bêta-lactamines, Toutes nos souches étaient sensibles à l'imipénème.

## 7. Recommandations

Aux autorités sanitaires

- ❖ Mettre en place un système de surveillance de prescription, de consommation et de dispensation des antibiotiques.
- ❖ Réaliser des enquêtes épidémiologiques sur la résistance aux antibiotiques.
- ❖ Communiquer les résultats pertinents au niveau national, régional et international.

Aux agents de santé

- ❖ Promouvoir la prescription rationnelle des antibiotiques.

Aux personnels du CICM

- ❖ De mieux renseigner les données sur les patients en ajoutant la provenance, le service de la demande.
- ❖ Pérenniser le système d'assurance qualité interne et externe pour permettre une grande fiabilité et reproductibilité des résultats.

A la population

- ❖ Eviter l'automédication et utiliser les antibiotiques uniquement lorsqu'ils sont prescrits par un médecin.

## Références

1. Belmonte O, Drouet D, Alba J, Mourlan C. Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. 2009;58:18-24.
2. Ouedraogo AS, Jean Pierre H, Banuls AL, Ouédraogo R, Godreuil S. Emergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest. Juin 2017;27(2):147-54.
3. Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Premier rapport de l'OMS sur la résistance aux antibiotiques: une menace grave d'ampleur mondiale 2014 [Internet]. 2014. Disponible à: (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amrreport/fr/>). 2
4. Okeke I, Aboderin O, Byarugaba D, Ojo K, Opintan J. Growing problem of multidrug-resistant enteric pathogens in Africa. nov 2007;13(11):1640-6.
5. Rajiv Ranjan P, Vijay S, Satyendu S, Sunil K, Prabhat K. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Proteus Species* in Clinical Samples. 2016;5(4):962-8.
6. Wassif C, Cheek D, Belas A. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. J Bacteriol. 1995;177(20):5790-8.
7. Wang J-T, Chen P-C, Chang S-C, Shiau Y-R. Antimicrobial susceptibilities of *Proteus mirabilis*: a longitudinal nationwide study from the Taiwan surveillance of antimicrobial resistance (TSAR) program. BMC Infect Dis. 2014;47(4):95-273.
8. Avril J, Dabernat H, Denis F, Monteuil H. bactériologie clinique [Internet]. 3ème. Paris: Ellipses édition marketing S.A; 2000. 171-173 p. Disponible à: [http://zotero.org/support/quick\\_start\\_guide](http://zotero.org/support/quick_start_guide)
9. Fauchère J louis, Avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Paris: Ellipses; 2002. 365 p.
10. Ferron A. Bactériologie médicale. 15<sup>e</sup> éd. C et R; 157-163 p.

11. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae: introduction and identification. Dans: Manual of clinical microbiology. 9<sup>ème</sup>. Patrick R. Murray; 2007. p. 649-66.
12. Bonnet R. Beta-lactamines et Entérobactéries. Dans: AntibioGramme. 3<sup>ème</sup>. Paris: ESKA; 2012. p. 165-88.
13. Freney J, Croze M. ENTEROBACTERIACEAE- généralité. Dans: Précis de bactériologie clinique. 2<sup>ème</sup>. Paris: ESKA; 2007. p. 979-87.
14. Bimet F. Conservation des bactéries. Dans: Précis de bactériologie clinique. 2<sup>ed</sup> ESKA. Paris; 2007. p. 729-33.
15. *Proteus* Infections: Background, Pathophysiology, Epidemiology [Internet]. [cité 1 mai 2017]. Disponible à: <http://emedicine.medscape.com/article/226434-overview>
16. O'hara M, W. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*.
17. Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus spp.* Bacteria in Natural Environments. janv 2016;72:741-58.
18. Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. ESKA-12. Paris; 2000. 1200-1206 p.
19. Fiche technique santé-sécurité: agents pathogènes. Agence de la santé publique du Canada. 2011;4.
20. Murray R. P, Baron Jo E, Jorgensen H. J, Landry Louise M, Pfaller A. M. Manual of clinical microbiology. 9<sup>e</sup> éd. Vol. 1. Washington: Patrick R. Murray; 2007. 698-711 p.
21. DOUCET C. Entérobactéries. Juin 2008;22.
22. Freney J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P. Précis de bactériologie clinique. 2<sup>e</sup> éd. Paris: ESKA; 2007. 1037-1047 p.
23. Foris LA, Snowden J. *Proteus Mirabilis* Infections.
24. Gonzalez G, MD Medical Oncologist, The Center for Cancer and Blood Disorders. *Proteus* Infections.



25. 199-2015.pdf [Internet]. [cité 15 mai 2017]. Disponible à: <http://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/biblio/mmf/2015/199-2015.pdf>
26. Goudarzi L, Kermanshahi RK, Mousavinezhad Z, Soltan Dallal MM. Antimicrobial and Anti-Swarming Effects of Bacteriocins and Biosurfactants from Probiotic Bacterial Strains against *Proteus spp.* Journal of Medical Bacteriology. 2016;
27. Hartemann-Heurtier A, Marty L, Van GH, Grimaldi A. Place de l'antibiothérapie dans le traitement du pied diabétique. /data/revues/12623636/00260003/219/ [Internet]. 17 févr 2008 [cité 18 mai 2017]; Disponible à: <http://www.em-consulte.com/en/article/79885>
28. Chadli M, Sekhsoukh Y, Hmamouch K, Maleb A, Ez-zahraoui K, Elhamzaoui S. Arthrite septique à *Proteus mirabilis*. mars 2013;1(tome 35):19.
29. Mordi RM, Momoh MI. Incidence of *Proteus species* in wound infections and their sensitivity pattern in the University of Benin Teaching Hospital. Afr J Biotechnol. mars 2009;8:6.
30. NDIAYE AO. LES ENTEROBACTERIES SECRETRICES DES BETA-LACTAMASES A SPECTRE ELARGI. [Dakar]: Cheik Anta Diop; 2005.
31. HAMDUCHE CHAIMA TA. *Proteus mirabilis* au niveau CHU Constantine Caractérisation biochimique, microbiologique et la mutagénèse. [Algérie]: Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie; 2016.
32. Dalia Azher Ahmed. Prevalence of *Proteus spp.* in some hospitals in Baghdad City. Iraqi Journal of Science. 2015;665-72.
33. Pal N, Sharma N, Sharma R, Hooja S, Maheshwari RK. Prevalence of Multidrug (MDR) and Extensively Drug Resistant (XDR) *Proteus species* in a tertiary care hospital, India. 2014;3(10):243-52.
34. LEULMI Zineb EK. Les *Proteus* incriminés dans les infections communautaires et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques. [Constantine]:

Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie; 2015.

35. AHANOGBE Kokou AL. Résistance bactérienne en cas d'infections de plaies diabétiques: Diagnostic et Surveillance au Laboratoire Rodolphe Merieux de Bamako [Internet]. [Bamako]: FAPH; 2014. Disponible à: [www.keneya.net](http://www.keneya.net)
36. Alabi OS, Mendonça N, Adeleke OE, Silva GJ da. Molecular screening of antibiotic-resistant determinants among multidrug-resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* from SouthWest Nigeria. *Afri Health Sci*. Juin 2017;17(2):356-65.
37. Bontroki Aimen A, Gouri A, Yakhlef A, Gueroudj A, Bensouilah T. Résistance aux antibiotiques de souches isolées d'infection urinaires communautaires entre 2007 et 2011 a Guelma(Algérie). 2012;70(6):666-8.
38. INSTITUT LOUIS MALARDE. Etat de la Sensibilité aux Antibiotiques des Bactéries Isolées au Laboratoire de Biologie Médicale de L'INSTITUT LOUIS MALARDE. 2005;13.
39. Chen C-M, Lai C-H, Wu H-J, Wu L-T. Genetic characteristic of class 1 integrons in *Proteus mirabilis* isolates from urine samples. *Bio Med*. Juin 2017;7(2):12-7.
40. DIAKITE Oumou K. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés dans les infections ostéo-articulaires [Internet]. [Bamako]: FMPOS; 2010. Disponible à: [www.keneya.net](http://www.keneya.net)
41. Endimiani A, Luzzaro F, Perilli M, Toniolo A. *Proteus mirabilis* Bloodstream Infections: Risk Factors and Treatment Outcome Related to the Expression of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Mars* 2005;49(7):2598–2605.
42. Nadezhda K. F, Eugeny I. A, Olga N. E, Irina A. A. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter spp.* isolated in Moscow, Russia. 2015;14-46.
43. Ya Bi Foua AR. Profil antibiologique des bactéries responsables d'infection urinaire communautaire. [Bamako]; 2006.
44. Tenoussé SAYE. Prévalence des Entérobactéries productrices de BLASE au CHU du Point G de 2006 à 2008. [Bamako]: FAPH; 2012.

## **FICHE SIGNALÉTIQUE**

**NOM :** DJOMBERA

**PRENOMS :** ZAINABE

**TITRE DE LA THESE :** SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE *PROTEUS* ISOLEES AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEX DE JANVIER 2015 A DECEMBRE 2017.

**ANNEE UNIVERSITAIRE :** 2018-2019

**VILLE :** BAMAKO

**VILLE DE SOUTENANCE :** BAMAKO

**PAYS :** MALI

**LIEU DE DEPOT :** BIBLIOTHEQUE DE LA FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTO-STOMATOLOGIE

**SECTEUR D'INTERET :** BACTERIOLOGIE, INFECTIOLOGIE

**Contact :** cel : 76894212 ; email : [zainabdjombera@gmail.com](mailto:zainabdjombera@gmail.com)

[zainabdjomberas@hotmail.fr](mailto:zainabdjomberas@hotmail.fr)

## **RESUME**

**Introduction :** L'émergence de la résistance bactérienne constitue un problème majeur de santé publique partout dans le monde et surtout en Afrique. Les entérobactéries telles que les *Proteus* sont incriminées dans les infections communautaires et nosocomiales. De ce fait ce présent travail propose une étude sur la résistance des bactéries du genre *Proteus* aux antibiotiques.

**Méthodologie :** ce travail est une étude rétro-prospective portant sur 3 ans (Janvier 2015 à Décembre 2017) au LRM du CICM

La méthode de la bactériologie classique a été utilisée pour l'identification et le test de sensibilité aux antibiotiques, à cet effet nous avons utilisé comme matériels les géloses Drigalski, Uriselect4 et MH et le Vitek<sup>2</sup> compact et le mini Api.

**Résultats :** Durant notre période d'étude 734 bactéries à Gram négatif ont été isolées parmi lesquelles 692 entérobactéries. 56 souches de *Proteus* ont été isolées soit 7,09%, ces échantillons provenaient en majorité des prélèvements de pus 96,43% et d'urines 3,57%. L'espèce majoritaire était le *Proteus mirabilis* avec 87,5%, *Proteus vulgaris* représentait seulement 8,93%.

Les niveaux de résistance très élevés ont été observés vis-à-vis des  $\beta$ lactamines (AMX=76,36%, TIC=66,07%, AMC=67,27 % FOX=65,96%) mais le TZP avait un taux de résistance relativement faible (36,11%).

Quant aux Aminosides, la résistance à la gentamicine était de l'ordre de 47,83%, la tobramycine 42% par contre elles étaient moins résistantes à l'amikacine (21,57%).

Les quinolones comme les  $\beta$ lactamines avaient un fort taux de résistance 68,63% pour NAL, 57,89% pour CIP/OFL et 40,74% pour PEF/NOR.

L'imipénème reste l'antibiotique le plus actif (aucun cas de résistance).

**Conclusion** Notre étude nous a permis d'observer un fort taux de résistance aux différentes classes d'antibiotiques. L'imipénème reste l'antibiotique le plus actif avec un taux de sensibilité de 100% à toutes les souches testées.

**Mots clés :** *Proteus*, Antibiotiques, Résistance, CICM Bamako, Mali.

## Descriptive card

Name: DJOMBERA

First name: Zainabe

Address: zainabdjombera@gmail.com

Nationality: Malian

TITLE: SURVEILLANCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ISOLATED *PROTEUS* IN THE RODOLPHE MERIEUX LABORATORY FROM JANUARY 2015 TO DECEMBER 2017

Academic year: 2017-2018

Place of deposit: Library of the faculty of medicine, pharmacy and odonto-stomatology.

Sector of interest: bacteriology, Infectious Diseases.

Abstract:

Introduction: The emergence of bacterial resistance is a major public health problem all over the world and especially in Africa. Enterobacteria such as *Proteus* are incriminated in community and nosocomial infections. Therefore this present work proposes a study on the resistance of *Proteus* bacteria to antibiotics.

Methodology: this work is a 3-year prospective retrospective study (January 2015 to December 2017) at the CICM LRM

The classical bacteriology method was used for the identification and the antibiotic susceptibility test, for this purpose Drigalski, Uriselect4 and MH agars and Vitek2 compact and mini Api were used as material.

Results: During our study period, 734 Gram-negative bacteria were isolated, including 692 enterobacteria. 56 strains of *Proteus* were isolated, ie 7.09%, these samples came mostly from 96.43% pus and 3.57% urine. The majority species was *Proteus mirabilis* with 87.5%, *Proteus vulgaris* accounted for only 8.93%.

Very high resistance levels were observed for  $\beta$ -lactams (AMX = 76.36%, TIC = 66.07%, AMC = 67.27% FOX = 65.96%) but TZP relatively low resistance (36.11%).

As for Aminoglycosides, resistance to gentamicin was in the order of 47.83%, while tobramycin 42% was less resistant to amikacin (21.57%).

Quinolones such as  $\beta$ -lactams had a high resistance level of 68.63% for NAL, 57.89% for CIP / OFL and 40.74% for PEF / NOR.

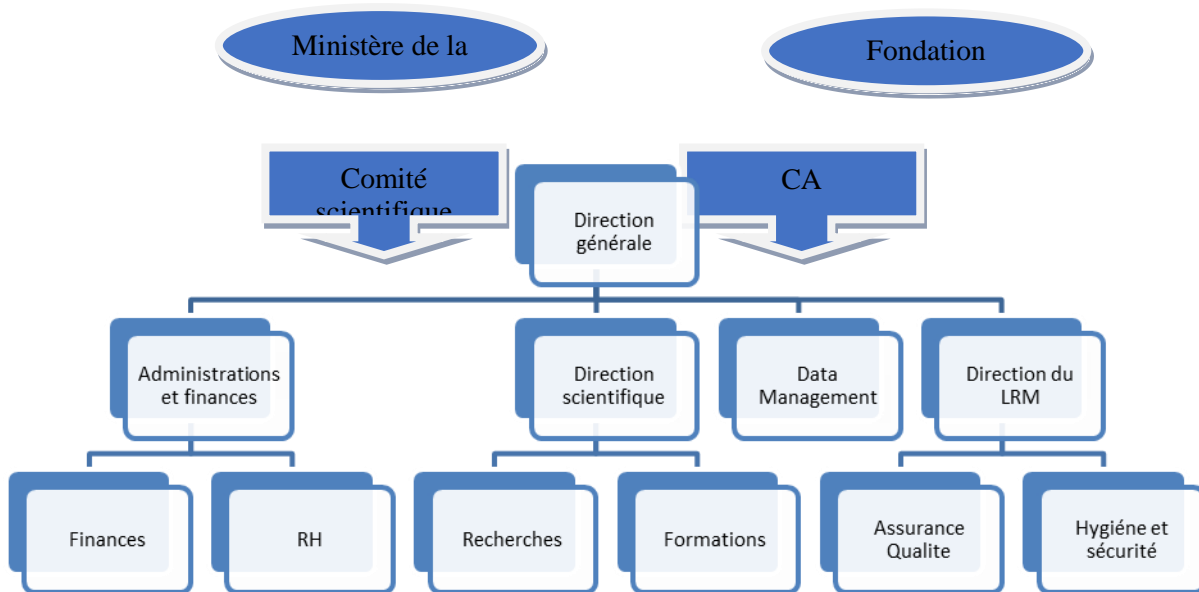
Imipenem remains the most active antibiotic (no case of resistance).

Conclusion: Our study has allowed us to observe a high rate of resistance to different classes of antibiotics. Imipenem remains the most active antibiotic with a sensitivity of 100% to all strains tested.

Keywords: *Proteus*, Antibiotics, Resistance, CICM Bamako, Mali.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Organigramme du CICM



## Annexe 2 : MODE OPERATOIRE DE 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  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 3 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES**

Rédigé le:	21/02/201	Par : Doussou	DC	Visa :
Vérifié le:	25/03/201	Par : Judicaël	JO	Visa :
Approuvé le:	25/03/201	Par : Dr Bréhima TRAORE	BT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	25/03/201	Par : Abderrhamane	AM	Visa :
Approuvé le:	25/03/201	Par : Dr Madiné	MTT	Visa :
Mise en application	25/04/201	Par :		Version N° 1
Date de revue :	25/03/201			
Objet de la	Révision annuelle			
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**

**Procédure de gestion des déchets**

**MO: Mode opératoire de la coloration de Gram**

**Mode opératoire d'utilisation du VITEK2**

**COMPACT Mode opératoire d'utilisation du mini Api**

#### **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<sup>2</sup> Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette VITEK<sup>2</sup> Compact.

#### **3. Consommables**

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,
- Tubes à hémolyse,
- Oeses,

- Cartes VITEK<sup>2</sup> 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 la 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	Narine	plaie	Cathéter
	oreille			
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 M07ANA BAC-021V1**

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

#### **6.1.3. Culture**

- Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu:
  - Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>.

- Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO<sub>2</sub>.
- Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose.
- Drigalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif).
- Chapman, incubé en aérobiose.
- Sabouraud, incubé en aérobiose(en fonction du prélèvement).
- CAN2, incubé en aérobiose.
- Mueller Hinton, incubé en aérobiose.
- 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 citées 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, réincuber les géloses au sang sous CO<sub>2</sub> 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, discuter 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...).

### ***.1.5. Interprétation des antibiogrammes***

- Lorsqu'elle est réalisée à partir des disques sur milieu MH 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 CAZ 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 manipuler en présence d'une flamme
- Toujours porter 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 paillasse
- 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. P10HYG-002V1**

### **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 4 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES**

Rédigé le:	21/02/200	Par : AlHadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	22/02/200	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	23/02/200	Par : Fatou FayeTRAORE	FFT	Visa :
Modifié le:	21/02/201	Par : Tony ZITTI	LD	Visa :
Vérifié le :	25/03/201	Par : Abderrhamane	AM	Visa :
Approuvé le:	25/03/201	Par : Dr Madiné	MTT	Visa :
Mise en application	25/04/201	Par :		Version N° 4
Date de revue :	25/03/201			
Objet de la				
Archivé le :				

**Document provisoire  
opérationnel**



**X Document**

**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.  
P10HYG-002V1**

**MO:                Mode opératoire du prélèvement cyto bactériologique des  
urines Réf.M07ANABAC-029**

**Mode opératoire d'utilisation du Vitek2 Compact Réf. M07ANABAC-019V1**

**Mode opératoire d'utilisation du mini Api Réf. M07ANABAC-014V1**

**Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07ANABAC-009V2**

**Mode opératoire du test de la coagulase Réf.M07ANABAC-023V1**

**Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07ANABAC-025V2**

**Mode opératoire de la technique de coloration de Gram Réf. M07ANABAC-022V2**

**Mode opératoire d'utilisation de la cellule Kova Réf. M07ANABAC-001V1**

**Mode opératoire d'utilisation du microscope Réf. M04MAT**

## **– Buts**

Décrire le mode de l'examen cytobactériologique des urines.

## **II -Domaines et personnels concernés**

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

## **III -Abréviations/Définitions**

LRM: Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines

BK : Bacille de Koch

*E. coli*: *Escherichia coli*

NaCl: Chlorure de sodium

ATB: Antibiogramme

## **IV – Références**

## **V – Contenu**

# MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

### **1. Principe**

L'examen cytobactériologique 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 VITEK2.

### **3. Consommables**

- Oese;
- Cartes VITEK2 Compact;
- Cellule de numération (Kova® slide) ;

- Bandelette (3 paramètres);
- Tube conique (10à20 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 cytobactériologique des urines. Réf. M07ANABAC-029V2**

#### **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 $\mu$ l :
  - Immerger l'oese dans l'urine en la tenant verticalement.
  - Décharger le contenu de cette oese en appuyant la boucle sur le haut de la gélose Uri select 4.
  - Tirer de ce point une verticale jusqu'au 1/3 de la boîte.
  - Sans recharger l'oese, faire des stries perpendiculaires serrées en partant du point de dépôt jusqu'à la fin;
  - 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'examen microscopique**

- Comptage des éléments

Après agitation délicate (pourra voir des urines homogènes), mettre 10 $\mu$ 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 :

## □ 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 Vitek2 Compact si Indole négative car *E. coli* est **Indole positive**.

Un faible pourcentage de souches d'autres bactéries possèdent une activité  $\beta$ -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 ya forte présomption de bactéries non fermentaires

(*Pseudomonas, Burkholderia...*);

- 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. M07ANABAC-025V2**

## **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 où 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 paillasses;
- 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.

## **73. Gestion des déchets**

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à 12° chlorimétrique. 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. P10HYG-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 5 : 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 :	25/03/2017			
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**

**MODE:**

### **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 a un volume de  $1 \mu\text{l} = 1\text{mm}^3$  ;
- 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  $\mu\text{l}$  ou  $\text{mm}^3$  ;
- 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 :
  - Pour les urines : leucocytes, hématies, cristaux, cylindres, cellules épithéliales...;
  - 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 6 : 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	AM A	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**

**Exemplaires :** - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur

**Documents Qualité liés:**

**MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako**

**P:**

**MO:**

**D:**

**E:**

**X**

**Document**

**opérationnel**



## 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

<b>Souche</b>	<b>Résultats</b>
<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**
  - L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.
  - 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 7 : MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE LA CATALASE

Rédigé le:	24/02/200 5	Par : Al Hadji SIDIBE	AS	Visa :
Vérifié le:	03/03/200 5	Par : Louis DEWEERDT	LD	Visa :
Approuvé le:	04/03/200 5	Par : Fatou Traoré FAYE	FTF	Visa :
Modifié le:	21/02/201 3	Par : AHANOGBE Lem K. A	AL	Visa :
Vérifié le :	22/04/201 6	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:	22/04/201 6	Par : Dr Madiné TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application le :	22/05/201 6			Version N° 2
Date de revue :	22/04/201 7			
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 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
  - **Déposer sur la lame une goutte d'ID color catalase;** ○  
**Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ;**
  - **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 8 : MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API

Rédigé le:	22/02/201 3	Par : Abderrhamane MAIGA	AM A	Visa :
Vérifié le:	14/03/201 6	Par : Judicaël OUEDRAOGA	JO	Visa :
Approuvé le:	14/03/201 6	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Modifié le:		Par :		Visa :
Vérifié le :	14/03/201 7	Par : Judicaël OUEDRAOGA	JO	Visa :
Approuvé le:	14/03/201 7	Par : Dr Madine TALL TOURE	MTT	Visa :
Mise en application :	14/04/201 6			Version N° 1
Date de revue :	14/03/201 8			
Objet de la modification:	Révision annuelle			
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 l'utilisation en routine du Mini Api.

## **II - Domaines et personnel concerné**

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

## **III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

## **IV – Références**

## **V – Contenu**

### **MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU MINI API**

#### **1. Principe**

Le Mini API permet deux types de lecture.

##### **1.1. La lecture turbidimétrique**

Elle est destinée aux galeries turbidimétriques.

##### **Exemple :**

ID 32 GN

ID 32 C

ATB 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	<b>3 ans</b> après la fin de leur utilisation
Traçabilité AQ	Fiche de vie Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après
Document fabricant	Manuel d'utilisation et Manuel Instrument Mini Api	Laboratoire Bactériologie	Pendant la durée de vie de l'appareil et <b>3 ans</b> après

### **Annexe 9 : 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** **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 souchothèque.

**II - Domaines et personnels concernés**

Le secteur de Bactériologie. Tout le personnel susceptible d'utilisé 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  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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 ( $-80^{\circ}\text{C}$ )

## 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 repartir 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).

### **Annexe 10 : PROCEDURE DE PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE**

Titre : **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**

**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:**

**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.	<a href="#"><u>PRINCIPE.....</u></a>	<a href="#"><u>3</u></a>
2.	<a href="#"><u>MATERIEL .....</u></a>	<a href="#"><u>3</u></a>
3.	<a href="#"><u>CONSOMMABLE .....</u></a>	<a href="#"><u>3</u></a>
4.	<a href="#"><u>REACTIF .....</u></a>	<a href="#"><u>3</u></a>
5.	<a href="#"><u>MODE OPERATOIRE.....</u></a>	<a href="#"><u>3</u></a>
6.	<a href="#"><u>HYGIENE ET SECURITE.....</u></a>	<a href="#"><u>4</u></a>
	<a href="#"><u>EVALUATION DES RISQUES.....</u></a>	<a href="#"><u>4</u></a>
	<a href="#"><u>NETTOYAGE DE LA SALLE .....</u></a>	<a href="#"><u>6</u></a>
	<a href="#"><u>EVACUATION DES EAUX USEES.....</u></a>	<a href="#"><u>6</u></a>
7.	<a href="#"><u>ARCHIVAGE .....</u></a>	<a href="#"><u>6</u></a>

## **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'erenmeyer : 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 <b>300 Millilitres</b> d'eau	Quantité de poudre pour <b>1 litre</b> d'eau	Autoclavage
Bouillon Cœur / Cerveille	11,10 g	37 g	15 mn à 120°C
Müller 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

### Evaluation des risques

	Indice	Degré de gravité
<b>Gravité</b>	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 milieu	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
Machinerie	Panne autoclave	Salle des milieux de culture	Ne pas pouvoir stériliser des matériaux	Dysfonctionnement de l'appareil / mauvais entretien	3	Bien entretenir les 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
Chute d'objets / Produits	Chute des pots contenant les poudres déshydratées	Salle des milieux de culture	Blessure, casse	Pièce humide, étagères en mauvais état	2	Vérifier les étagères annuellement



Imprimé le jeudi 23 mars 2017

### **Nettoyage de la salle**

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

### **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

### **7. 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 L'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT**

Titre: **MODE OPERATOIRE DE L'UTILISATION DU VITEK 2 COMPACT**

Rédigé le:	22/02/2013	Par : Sandrine	S	Visa :
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Nana Kadidia KEITA	NK	Visa :
Approuvé le:	25/03/2016	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 :	25/04/2016			Version N° 1
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:**

**D:**

**E:**

**I – Buts**

Décrire le mode d'utilisation du vitek 2 Compact.

**II - Domaines et personnels concernés**

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

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

**IV – Références**

Manuel d'utilisation du Vitek 2 Compact

**V – Contenu**

**MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU VITEK  
2 COMPACT**

**1. Principe**

Le système Vitek 2 Compact est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.

Le logiciel fourni par le système Vitek 2 Compact inclut des programmes d'analyses, de gestion de données et un système de contrôle de qualité afin de valider le kit test du Vitek 2 Compact.

**2. Mode opératoire**

- Prendre le flacon eau saline Vitek 2, introduire la dispensette ;
- Prendre des tubes secs pour Vitek 2, y introduire dans les puits de la cassette ;
- La cassette peut prendre jusqu'à 10 tubes soit 2x5 (identification+ antibiogramme) ;
- Mettre dans chaque tube, 3ml de la solution saline du Vitek 2 à l'aide de la dispensette préalablement réglée à 3 ml.

▪ **Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés** dont l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;
- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une oese, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien vortexer ;
- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à **0,5 McFarland** ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;
- Préparer la solution pour antibiogramme :
  - Si la bactérie à identifier est à :
    - Gram positif, utiliser la micropipette calibrée à 280µl (bleue), Gram négatif, utiliser la micropipette calibrée à 145µl (rouge) ;
  - A partir de la suspension bactérienne, pipeter en fonction de la nature du germe suspecté (BGN ou BGP) et diluer dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.
- Placer la carte d'identification (soit GN, soit GP ou YST) et la carte pour l'antibiogramme (soit AST- N, soit SST- P ou AST- Y) en fonction de la nature du germe sur la cassette.

**NB:** différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
- Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 22233

## **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 !**