

## Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako



Faculté de Pharmacie

Année universitaire 2017-2018

Thèse N° .....

**Contribution du Laboratoire Rodolphe Mérieux de  
Bamako dans la surveillance de la résistance aux  
antimicrobiens : cas des bacilles à Gram négatif  
fermentaires et non fermentaires multi-résistants**

Thèse présentée à la faculté de Pharmacie  
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie (Diplôme d'Etat)

**par**

**Mme Nèma DEMBELE**

soutenue publiquement le .....

**Jury**

Président : Pr Amagana DOLO  
Membres : Dr Seydou DIARRA  
Dr Lassina Gadi TIMBINE  
Co-directeur : Dr Ibréhima GUINDO  
Directeur : Pr Souleymane DIALLO

## LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

### ADMINISTRATION

Doyen : **Boubacar TRAORE**, Professeur

Vice-doyen : **Ababacar I. MAIGA**, Professeur

Secrétaire principal : **Seydou COULIBALY**, Administrateur civil

Agent comptable : **Famalé DIONSAN**, Inspecteur des finances.

### ➤ PROFESSEURS HONORAIRES

N	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Boubacar Sidiki	CISSE	Toxicologie
2	Mahamadou	CISSE	Biologie
3	Daouda	DIALLO	Chimie générale et minérale
4	Souleymane	DIALLO	Bactériologie - Virologie
5	Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
6	Boukassoum	H Aidara	Législation
7	Moussa	HARAMA	Chimie Organique (dé-cédé)
8	Gaoussou	KANOUTE	Chimie Analytique
9	Alou A.	KEITA	Galénique
10	Mamadou	KONE	Physiologie
11	Mamadou	KOUMARE	Pharmacognosie
12	Bréhima	KOUMARE	Bactériologie et Virologie
13	Abdourahamane S.	MAIGA	Parasitologie

14 | Elimane | MARIKO | Pharmacologie

➤ **DER : SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES**

**1. PROFESSEURS / DIRECTEURS DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mounirou	BABY	Hématologie
2	Bakary Mamadou	CISSE	Biochimie
3	Abdoulaye	DABO	Biologie / Parasitologie
4	Mahamadou	DIAKITE	Immunologie-Génétique
5	Alassane	DICKO	Santé Publique
6	Amagana	DOLO	Parasitologie - Mycologie
7	Akory Ag	IKNANE	Santé Publique/Nutrition
8	Ousmane	KOITA	Biologie-Moléculaire
9	Boubacar	TRAORE	Parasitologie - Mycologie

**2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Flabou	BOUGOUDOGO	Bactériologie-Virologie
2	Abdoulaye	DJIMDE	Parasitologie - Mycologie
3	Bourèma	KOURIBA	Immunologie <b>chef de DER</b>
4	Ousmane	TOURE	Santé Publique/Santé Environnement

**3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mohamed	AG BARAIKA	Bactériologie-Virologie
2	Charles	ARAMA	Immunologie

3	Boubacar Tiétiè	BISSAN	Biologie Clinique
4	Djibril Mamadou	COULIBALY	Biochimie Clinique
5	Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie Clinique
6	Souleymane	DAMA	Parasitologie Entomologie méd.
7	Djénéba Koumba	DABITAO	Biologie Moléculaire
8	Laurent	DEMBELE	Biotechnologie Microbienne
9	Kléligui Casimir	DEMBELE	Biochimie Clinique
10	Seydina S.A.	DIAKITE	Immunologie
11	Yaya	GOITA	Biochimie Clinique
12	Aldjouma	GUINDO	Hématologie
13	Ibrahima	GUINDO	Bactériologie-Virologie
14	Kassoum	KAYENTAO	Santé Publique Biostatistiques
15	Aminatou	KONE	Biologie Moléculaire
16	Birama Apho	LY	Santé Publique
17	Dinkorma	OUOLOGUEM	Biologie Cellulaire
18	Issiaka	SAGARA	Santé Publique/ Biostatistiques
19	Samba Adama	SANGARE	Bactériologie
20	Fanta	SANGHO	Santé Publique/ Santé Communautaire
21	Mahamadou Soumana	SISSOKO	Santé Publique/ Biostatistiques

#### **4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Djénéba	COULIBALY	Nutrition/Diététique
2	Issa	DIARRA	Immunologie
3	Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique – Biologie végétale
4	Fatou	DIAWARA	Epidémiologie
5	Merepen dit Agnès	GUINDO	Immunologie
6	Oumar	GUINDO	Epidémiologie
7	Falaye	KEITA	Santé Publique/Santé Environ.
8	N'Deye Lallah Nina	KOITE	Nutrition

9	Yacouba	MAIGA	Biostatistique
10	Amadou Birama	NIANGALY	Parasitologie-Mycologie
11	Oumar	SANGHO	Epidémiologie
12	Djakaridia	TRAORE	Hématologie

➤ **DER : SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Drissa	DIALLO	Pharmacognosie
2	Saïbou	MAIGA	Législation
3	Rokia	SANOGO	Pharmacognosie <b>Chef de DER</b>

**2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRES DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
-	Néant	-	-

**3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière
2	Bakary Moussa	CISSE	Galénique
3	Yaya	COULIBALY	Législation
4	Issa	COULIBALY	Gestion
5	Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
6	Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
7	Moussa	SANOGO	Gestion
8	Adiaratou	TOGOLA	Pharmacognosie

**4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Seydou Lahaye	COULIBALY	Gestion Pharmaceutique
2	Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques

3	Daouda Lassine	DEMBELE	Pharmacognosie
4	Adama	DENOU	Pharmacognosie
5	Sékou	DOUMBIA	Pharmacognosie
6	Mahamane	HADARA	Pharmacognosie
7	Assitan	KALOGA	Législation
8	Ahmed	MAIGA	Législation
9	Aichata Ben Adam	MARIKO	Galénique
10	Aboubacar	SANGHO	Législation
11	Bourama	TRAORE	Législation
12	Karim	TRAORE	Sciences Pharmaceutiques
13	Sylvestre	TRAORE	Gestion Pharmaceutique
14	Aminata Tièba	TRAORE	Pharmacie Hospitalière
15	Mohamed dit Sarmoye	TRAORE	Pharmacie Hospitalière

## **DER : SCIENCES DU MEDICAMENT**

### **1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Ousmane	DOUMBIA	Pharmacie Chimique
2	Bénoit Yaranga	KOUMARE	Chimie Analytique
3	Ababacar I.	MAIGA	Toxicologie

### **2. MAITRES DE CONFERENCE / MAITRE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Sékou	BAH	Pharmacologie <b>Chef de DER</b>

### **3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Dominique Patomo	ARAMA	Pharmacie Chimique
2	Mody	CISSE	Chimie Thérapeutique
3	Tidiane	DIALLO	Toxicologie
4	Hamadoun Abba	TOURE	Bromatologie

### **4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mahamadou	BALLO	Pharmacologie
2	Dalaye Bernadette	COULIBALY	Chimie Analytique
3	Blaise	DACKOUCO	Chimie Analytique
4	Fatoumata	DAOUCO	Pharmacologie
5	Ousmane	DEMBELE	Chimie Thérapeutique
6	Abdourahamane	DIARA	Toxicologie
7	Aiguerou dit Abdoulaye	GUINDO	Pharmacologie
8	Madani	MARIKO	Chimie Analytique
9	Mohamed El Béchir	NACO	Chimie Analytique
10	Mahamadou	TANDIA	Chimie Analytique
11	Dougoutigui	TANGARA	Chimie Analytique

➤ **DER : SCIENCES FONDAMENTALES**

**1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Mouctar	DIALLO	Biologie <b>Chef de DER</b>
2	Cheick F.	TRAORE	Biologie / Entomologie
3	Mahamadou	TRAORE	Génétique

**2. MAITRES DE CONFERENCES / MAITRE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Lassana	DOUMBIA	Chimie Appliquée

**3. MAITRES ASSISTANTS / CHARGE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Abdoulaye	KANTE	Anatomie
2	Boureïma	KELLY	Physiologie Médicale

**4. ASSISTANTS / ATTACHE DE RECHERCHE**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
----	---------	-----	------------

1	Seydou Simbo	DIAKITE	Chimie Organique
2	Modibo	DIALLO	Génétique
3	Moussa	KONE	Chimie Organique
4	Massiriba	KONE	Biologie Entomologie

➤ **CHARGES DE COURS (VACATAIRES)**

NO	PRENOMS	NOM	SPECIALITE
1	Cheick Oumar	BAGAYOKO	Informatique
2	Babou	BAH	Anatomie
3	Abdourahamane	COULIBALY	Anthropologie Médicale
4	Souleymane	COULIBALY	Psychologie
5	Bouba	DIARRA	Bactériologie
6	Modibo	DIARRA	Nutrition
7	Moussa I.	DIARRA	Biophysique
8	Babacar	DIOP	Chimie
9	Atimé	DJIMDE	Bromatologie
10	Yaya	KANE	Galénique
11	Boubacar	KANTE	Galénique
12	Aboubakary	MAIGA	Chimie Organique
13	Massambou	SACKO	SCMP / SIM
14	Modibo	SANGARE	Anglais
15	Sidi Boula	SISSOKO	Histologie-Embryologie
16	Fatoumata	SOKONA	Hygiène du Milieu
17	Fana	TANGARA	Maths
18	Abdel Kader	TRAORE	Pathologies Médicales
19	Boubacar	ZIBEIROU	Physique





## DEDICACE

### Je dédie cette thèse :

Au Seigneur Jésus-Christ par qui je pu tout, c'est toi qui est capable de tout accomplir dans ma vie au-delà même de mes désirs. Louange et gloire à ton nom.

A mon mari Noé Dara

A mon père Dr Antoine Dembélé

A ma mère Jeanne Dembélé

A mon frère Noé Dembélé

A ma Sœur Rosalie Dembélé

A mes beaux-parents Marc Dara et Aminata Kéita

Vous m'avez toujours soutenu durant ce cycle par votre présence, amour, et conseils. Ceux sur qui je me rabattais dans les bons et mauvais moments, vous êtes une bénédiction pour moi.

### Remerciements

**Dr Moussa Diawara** pour ta confiance et le grand frère toujours prêt à donner. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi.

**Dr Youssouf Diarra** tu as toujours été là depuis le début, les mots me manquent pour définir le grand homme que tu es. Ton humilité, ton courage et ta soif d'aller toujours plus loin ne cessent de m'impressionner et m'influencer. Grand respect pour toi Dr Merci d'avoir été là pour moi.

**Dr Ahanogbe Kokou Anani Lem** tu as toujours vu le meilleur en moi. Homme de science, mon grand frère, merci pour tout ce grand soutien.

**Dr Diaw Nana Kattrra** merci de m'avoir toujours ouvert les portes de votre établissement, vous êtes pour moi un modèle de la perfection.

**Dr Patrice Dembélé** grand conseiller et visionner, mon grand frère et mon ami. La distance n'a jamais rien changé à ton soutien et à ta présence pour moi.

**Dr Cheick Diakité** merci de m'avoir ouvert les portes de votre établissement.

**Personnel du CICM et de la pharmacie les HALLES** pour leur aide et leur soutien. Merci pour la formation à vos côtés.

**A mes maitres** : Merci pour vos précieux conseils et encouragements.

**A tous mes camarades et Amis de la Promotion N'golo Diarra** pour toutes ces longues années d'étude ensemble. Vous avez tous été une source de motivation pour moi. Et mention spéciale pour toi **Dr Aly Mallé** tu es toujours là au moment qu'il faut comme mon partenaire de tous les temps.

**Au Groupe biblique (GBEEM)** pour les moments de spiritualité passés ensemble.

**A la famille Coulibaly du point G** : merci pour votre accueil et l'hébergement pendant tout ce cycle.

**Merci à tous.**

## **HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY**

**A notre Maître et Président du jury**

**Professeur Amagana DOLO**

- **Docteur en Pharmacie,**
- **Ph.D en Parasitologie,**
- **Professeur Agrégé de Parasitologie-Mycologie,**
- **Chercheur au MRTC**

Merci de l'honneur que vous nous faites de présider notre jury.

Veillez-trouver ici notre reconnaissance et profond respect.

**A Notre Maître et juge**

**Docteur Lassina Gadi TIMBINE**

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

Vous nous honorez en acceptant d'examiner notre travail. Votre simplicité et  
Votre disponibilité pendant notre parcours au CICM nous ont marqué. Retrouvez ici notre  
profond respect.

## A notre Maître et Juge

### Docteur Seydou DIARRA

- **Spécialiste en microbiologie**
- **Ancien chef de service bactériologique à l'INRSP**
- **Maitre chargé de l'enseignement de la bactériologie à l'institut de formation des techniciens de laboratoire**

Cher Maître

Permettez-nous de vous dire combien nous avons été touchées par votre disponibilité et votre abord facile .Acceptez tous nos remerciements pour votre participation.

## **A notre Maître et co-directeur**

### **Docteur Ibréhima GUINDO**

- **Pharmacien biologiste;**
- **Chef du service bactériologie-virologie de l'Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP);**
- **Maitre-assistant de Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie.**

Plus qu'un Maître, vous avez été un protecteur pour nous. Votre ouverture et vos qualités de perfectionniste font de vous un Maître apprécié. Recevez l'expression de notre profonde reconnaissance..

**A notre Maître et Directeur de thèse**

**Professeur Souleymane DIALLO**

- **Pharmacien biologiste,**
- **Colonel Major à la retraite (Service de Santé des Armées),**
- **Professeur de Bactériologie et Virologie,**

**Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Mali (2012-2017).**

Cher Maître, nous vous remercions de nous avoir accepté. Votre compétence et votre rigueur scientifique font de vous un Maître distingué. Veuillez-accepter nos sentiments d'admiration et un profond respect.

## **SOMMAIRE**

---



<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Objectifs.....</b>	<b>25</b>
2.1.1	Objectif général.....	25
2.1.2	Objectifs spécifiques.....	25
<b>3</b>	<b>Généralités sur la résistance des bactéries aux antibiotiques. ....</b>	<b>26</b>
3.1	Historique.....	26
3.2	La résistance bactérienne.....	26
3.2.1	Définition.....	26
3.2.2	Types de résistance.....	26
3.3	Mécanisme biochimique de la résistance (16).....	27
3.3.1	Inactivation enzymatique de l'antibiotique.....	28
3.3.2	Modification de la cible.....	28
3.3.3	Séquestration de l'antibiotique, protection de la cible.....	30
3.3.4	Baisse de la perméabilité membranaire/ imperméabilité.....	31
3.3.5	Efflux.....	31
3.4	Bactéries multi-résistantes.....	34
3.4.1	Définition.....	34
3.4.2	Les principales bactéries multi-résistantes.....	35
3.4.3	Principaux facteurs d'émergence des BMR en Afrique de l'ouest.....	36
3.4.4	Conséquences de la multi-résistance.....	36
3.5	Entérobactéries.....	36
3.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	37
3.7	<i>Acinetobacter baumannii</i> Complexe.....	37
<b>4</b>	<b>Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques (28) .....</b>	<b>37</b>
4.1	Sensibilité aux Bêta-lactamines.....	37
4.2	Sensibilité aux aminosides.....	40
4.3	Sensibilité aux quinolones.....	41
4.4	Sensibilité aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à gram négatifs.....	41
<b>5</b>	<b>Sensibilité des Bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques (29) .</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>42</b>

6.1	Cadre de l'étude .....	42
6.2	Type d'étude.....	43
6.3	Période d'étude.....	43
6.4	Population d'étude.....	43
6.5	Collecte de données.....	43
6.6	Méthodes .....	44
6.6.1	Antibiogramme .....	44
6.6.2	Technique de souchothèque.....	49
-	Principe.....	49
6.7	Analyse et traitement des données .....	51
<b>7</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>52</b>
7.1	Pourcentage des BMR à Gram négatif isolées au cours de 2016-2017 au LRM ...	52
7.2	Types de prélèvement.....	52
7.3	Répartition des échantillons selon la provenance .....	53
7.4	Répartition des bacilles multi-résistants isolées par groupe bactérien.....	54
7.5	Répartition des BMR selon le sexe des patients .....	55
7.6	Répartition des BMR selon la Tranche d'âge .....	56
7.7	Fréquence d'isolement des BMR selon le mois.....	56
7.8	Souches de BMR.....	57
7.9	Répartition des bactéries selon le type de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	58
7.10	Résistance aux aminosides .....	59
7.11	Résistance aux quinolones et aux autres types d'antibiotique .....	60
7.12	Profil de résistance aux antibiotiques des BGNnf .....	60
7.13	Les associations de résistance .....	62
7.14	Phénotypes de résistance.....	62
<b>8</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>65</b>
<b>9</b>	<b>Conclusion et recommandations .....</b>	<b>68</b>
9.1	Conclusion.....	68
9.2	Recommandations .....	68
<b>10</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>77</b>
<b>Sigles et abréviations</b>		

<b>Afssaps</b>	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
<b>AKN</b>	Amikacine
<b>AMC</b>	Amoxicilline+ acide clavulanique
<b>AMX</b>	Amoxicilline
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>AZT</b>	Aztréonam
<b>BCC</b>	Bouillon Cœur Cervele
<b>BGN</b>	Bactérie à Gram Négatif
<b>BGNMR</b>	Bactérie à Gram Négatif Multirésistantes
<b>BGNnF</b>	Bactéries à Gram Négatif non fermentaires
<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à spectre élargi
<b>BMR</b>	Bactéries multi-résistantes
<b>C3G</b>	Cephalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>ERC3G</b>	Entérobactérie Résistant aux Cephalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
<b>CA-SFM</b>	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
<b>CAZ</b>	Ceftazidime
<b>CFT</b>	Cefatrizine
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CTX</b>	Céfotaxime
<b>E-BLSE</b>	Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi
<b>EPC</b>	Entérobactéries productrices de carbapénémase
<b>FEP</b>	Céfépime
<b>FOS</b>	Fosfomycine
<b>FOX</b>	Céfoxitine
<b>GEN</b>	Gentamicine
<b>IN</b>	Infection nosocomiale
<b>IPM</b>	Imipénème
<b>LRM</b>	Laboratoire Rodolphe Mérieux
<b>MH</b>	Gélose de Mueller-Hinton
<b>NOR</b>	Norfloxacine
<b>PEF</b>	Péfloxacine
<b>R</b>	Résistant
<b>RAM</b>	Résistance Aux Antimicrobiens
<b>RAISIN</b>	Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosoco- miales
<b>S</b>	Sensible
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
<b>Spp</b>	Espèce
<b>SXT</b>	Triméthoprim-Sulfaméthoxazole

<b>TCS</b>	Bouillon Tryptone Caséine Soja
<b>TMP</b>	Triméthoprim
<b>TOB</b>	Tobramycine

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (16) .....	33
<b>Tableau II</b> : principales Bactéries Multi-résistantes (18). .....	35
<b>Tableau III</b> : antibiotiques testés sur les Entérobactéries (29) .....	48
<b>Tableau IV</b> : antibiotiques testés sur le BGNnF ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i> complexe) (29) .....	49
<b>Tableau VII</b> : prévalence des bacilles multi-résistantes selon la nature du prélèvement ..	52
<b>Tableau V</b> : répartition des souches de bacilles multi-résistantes isolée.....	57
<b>Tableau VI</b> : répartition par groupe bactérien des souches de bacilles multi-résistantes....	58
<b>Tableau VIII</b> : Les associations de résistance des entérobactéries .....	62
<b>Tableau IX</b> : associations de résistance des BGNnf.....	62
<b>Tableau X</b> : résistance acquise des bactéries représentatifs .....	62

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : résistance bactérienne (Source: mutation bactérienne-unBlog.fr).....	27
<b>Figure 2</b> : stratégies de la résistance des antibiotiques (Source: mutation bactérienne-unBlog.fr).....	32
<b>Figure 3</b> : automate VITEK® 2 Compact (Photo prise au LRM le 13/03/18) .....	46
<b>Figure 4</b> : image de BLSE prise au LRM .....	47
<b>Figure 5</b> : prévalence des BMR au LRM .....	52
<b>Figure 6</b> : répartition des BMR selon la provenance des prélèvements .....	53
<b>Figure 7</b> : répartition des BMR fermentaires selon la provenance des prélèvements .....	54
<b>Figure 8</b> : répartition des BMR non fermentaires selon la provenance des prélèvements ..	54
<b>Figure 9</b> : répartition des BMR selon le sexe des patients prélevés. ....	56
<b>Figure 10</b> : répartition des BMR isolées selon la tranches d'âge .....	56
<b>Figure 11</b> : fréquence d'isolement des BMR selon le mois de 2016 et 2017 au LRM de Bamako .....	57
<b>Figure 12</b> : répartition des souches BMR isolées par groupe bactérien <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
<b>Figure 13</b> : répartition des bactéries selon le type de résistance aux $\beta$ -lactamines .....	59
<b>Figure 14</b> : profil de résistance des Entérobactéries aux Aminosides .....	59
<b>Figure 15</b> :profil de résistance des Entérobactéries aux quinolones et aux autres ATB ....	60
<b>Figure 16</b> : profil de résistance des BGNnf aux $\beta$ -lactamines .....	61
<b>Figure 17</b> : profil de résistance aux aminosides et autres antibiotiques des BGNnf .....	61



## 1 Introduction

La chimiothérapie antibactérienne commencée en 1935, avait permis à l'époque une nouvelle ère qui s'est progressivement développée par la découverte de grandes familles d'antibiotiques (1). Elle a permis de remédier à plusieurs maux et de prolonger l'espérance de vie (2). Cependant depuis l'apparition des premiers cas de résistance en 1940, de nombreuses études ont montré que la résistance aux antibiotiques devient un problème de plus en plus important (3,4).

Selon l'OMS, la résistance aux antibiotiques atteint désormais des niveaux dangereusement élevés dans toutes les régions du monde (5). En 2013 **Woerther et al** ont estimé que 110 millions de personnes étaient porteurs de E-BLSE en Afrique (6). Une autre étude en 2017 portant sur l'émergence et la diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'ouest a montré que la menace est particulièrement inquiétante concernant la sécrétion de bêta-lactamases à spectre élargi chez les entérobactéries avec des prévalences variant de 10 à 100% et de 30 à 50% respectivement pour la colonisation et les processus infectieux. La même tendance est observée pour la résistance aux carbapénèmes chez les entérobactéries avec des taux de 10 à 30% (7).

Les bactéries développent des moyens de défense à toutes les familles d'antibiotiques. Cette résistance concerne aussi bien les hommes que les animaux (8). En Afrique plus précisément au Mali ceci constitue un réel fléau car les antibiotiques constituent une des classes de médicaments les plus commercialisés mais leur utilisation n'est pas contrôlée.

La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est l'image la plus grave de la résistance car elle réduit notablement les possibilités thérapeutiques. Auparavant nosocomiale, elle apparut vers les années 1970 quand des souches de *S. aureus* multi-résistantes devenaient endémiques dans les hôpitaux. A cela fut suivie l'apparition des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu chez les entérobactéries, les entérocoques résistants à la vancomycine ainsi que *P. aeruginosa* et *A. baumannii* multi-résistants. De nos jours nous assistons non seulement à l'émergence des carbapénémases mais également à la diffusion de toutes ces formes de multi-résistance dans la communauté (9,10).

Les bactéries à Gram négatif constituées majoritairement par la famille des Enterobacteriaceae et des bactéries à Gram négatif non fermentaires, occupent une place importante dans les infections humaines. Ces bactéries fréquemment rencontrées dans l'environnement, les hôpitaux et d'autres faisant partie de la flore intestinale de l'homme sont habituellement multi-résistantes de nos jours. En effet ces bactéries ont la grande propriété de pouvoir non seulement résister de façon naturelle aux antibiotiques (transmission verticale) mais également de façon acquise. Leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus importants et émergents sont les bêta-lactamases à spectre

étendu (BLSE), les carbapénémases, et les méthylases de l'ARN 16S qui confèrent une résistance aux aminosides.

Ces déterminants de résistance confèrent dans la plupart des cas une multi-résistance aux antibiotiques et sont observés chez les entérobactéries (notamment les souches communautaires), *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (11). L'heure est donc à la surveillance de la résistance en vue de connaître l'ampleur du problème et de trouver des stratégies adéquates de lutte (3).

L'OMS dans sa récente liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques priorise la surveillance de la résistance des BGN en raison de leurs capacités intégrées de trouver de nouveaux moyens de résister aux traitements et leur pouvoir à transmettre le matériel génétique permettant à d'autres bactéries de devenir elles aussi résistantes (12).

Etant donné qu'en Afrique il existe peu de données sur la surveillance de la résistance aux antimicrobiens, et que beaucoup de pays ne disposent pas d'un réseau de surveillance, nous constatons donc un manque d'information et de stratégies permettant de surveiller efficacement la résistance (13).

De plus en plus les bactéries multi-résistantes sont isolées dans les laboratoires.

Notre choix est porté sur les Bactéries à Gram Négatif en raison de leur haute présence dans les infections bactériennes.

Le laboratoire est un point clé dans la surveillance de la RAM car c'est là que sont acheminés les différents prélèvements des patients, c'est là que les bactéries sont isolées et c'est aussi là que les antibiotiques sont testés.



## **2 Objectifs**

### **2.1.1 Objectif général**

- Evaluer le niveau de résistance des bacilles multi-résistants à Gram négatif au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako au Mali de 2016-2017.

### **2.1.2 Objectifs spécifiques**

- Déterminer la fréquence d'isolement des bacilles Gram négatif multi-résistants isolés (BGNMR).
- Identifier les bacilles Gram négatif multi-résistants les plus retrouvés.
- Déterminer les familles d'antibiotiques les plus touchées par la multirésistance.

### 3 Généralités sur la résistance des bactéries aux antibiotiques.

#### 3.1 Historique

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses, les microorganismes ont développé des moyens de défense leur conférant une insensibilité aux antibactériens. Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes.

Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques.

La résistance aux antibactériens est un phénomène universel, qui semble plus aigu dans certains pays en développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables. Dans les pays industrialisés, le même phénomène peut être décrit du fait de la pression sélective dans un hôpital donné, ceci a été bien démontré avec l'usage intensif en monothérapie de la ceftazidime ou l'usage excessif de l'imipénème dans les unités de soins intensifs qui a permis l'émergence de *Stenotrophomonas maltophilia* (8).

#### 3.2 La résistance bactérienne

##### 3.2.1 Définition

Une bactérie est considérée comme résistante lorsqu'elle est capable de croître en présence de concentrations d'antibiotiques qui inhibent habituellement sa croissance (15).

##### 3.2.2 Types de résistance

###### - Résistance naturelle

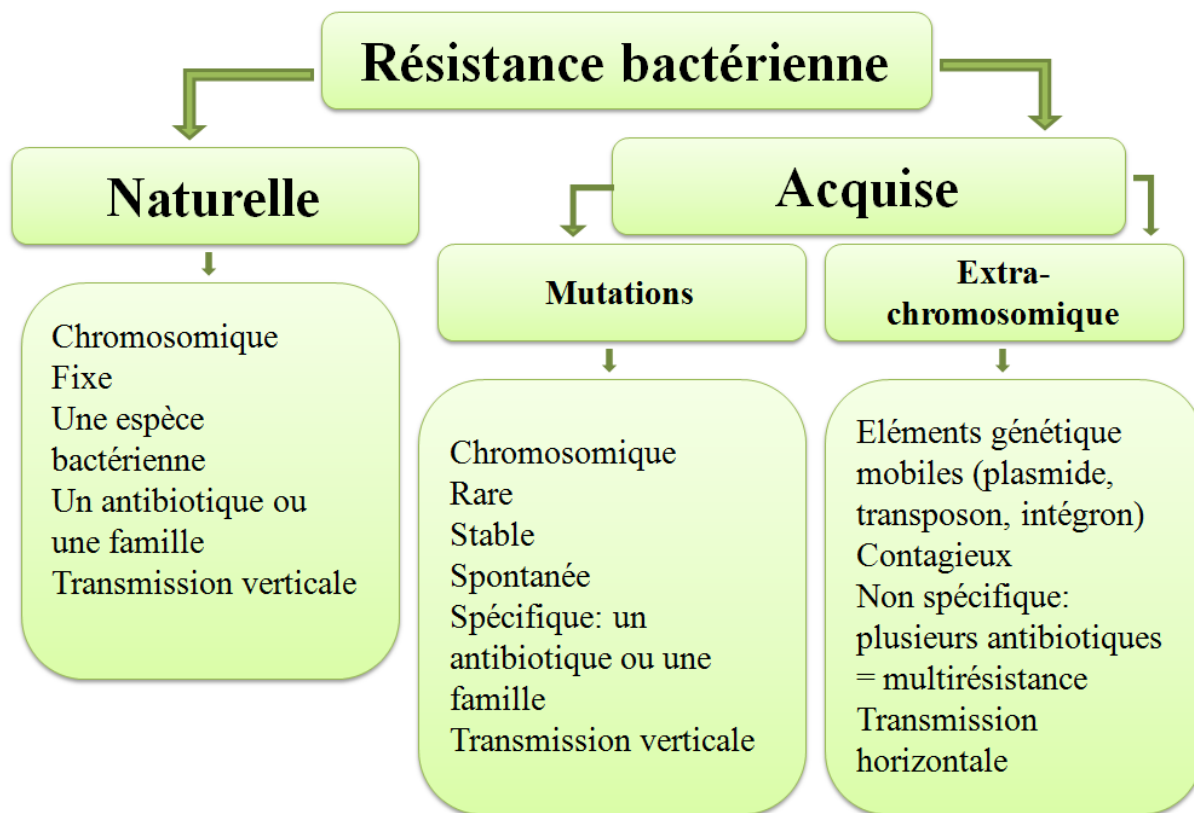
C'est une caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches de l'espèce concernée. Elle est portée par le chromosome et est transmissible à la descendance (transmission verticale).

La résistance naturelle détermine les phénotypes sauvages des espèces bactériennes.

###### - Résistance acquise

Elle touche certaines souches d'une espèce normalement sensible à l'antibiotique. Elle est liée à l'acquisition d'un ou de plusieurs mécanismes et détermine les phénotypes de

résistance, qui sont différents des phénotypes sauvages. Sa transmission horizontale est possible entre espèces différentes (15).



**Figure 1** : résistance bactérienne (Source: mutation bactérienne-unBlog.fr juin 2018)

### 3.3 Mécanisme biochimique de la résistance (16)

Les antibiotiques contrairement aux antiseptiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises telles que la synthèse de la paroi ( $\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), la réplication/ transcription de l'ADN (fluoroquinolones, rifampicine, sulfamides, triméthoprime), la synthèse protéique (aminosides, tétracyclines, macrolides et apparentés, chloramphénicol, oxazolidinones) ou encore la respiration cellulaire (polymyxines, daptomycine).

Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques le plus souvent intracellulaires.

Des facteurs complexes déterminent l'activité intrinsèque d'un antibiotique sur une espèce donnée, notamment l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible ( $C_{int}$ ). Ce dernier paramètre dépend évidemment de la concentration du produit dans le milieu où se trouve la bactérie ( $C_{ext}$ ), mais également d'autres éléments comme le niveau de perméabilité des membranes

à l'agent considéré (diffusion simple ou transport actif), l'existence éventuelle de mécanismes d'inactivation ou d'activation, ou encore la présence de systèmes d'efflux actif naturels pouvant s'opposer à son accumulation intracellulaire.

Les bactéries ont, par ailleurs, démontré leur capacité à accroître leur résistance aux antibiotiques par une multitude de mécanismes dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les produits. Les principales stratégies connues sont décrites ci-dessous et résumées dans le tableau I.

### **3.3.1 Inactivation enzymatique de l'antibiotique**

Un des mécanismes de résistance les plus répandus et les plus efficaces consiste, pour les bactéries, à modifier la structure même de l'antibiotique de façon à lui faire perdre sa capacité à se lier à sa cible cellulaire et, par voie de conséquence, à l'inhiber. Il repose sur la production d'enzymes dont l'origine peut être intrinsèque (gène chromosomique appartenant à l'espèce) ou extrinsèque (gène transmis par des plasmides ou des transposons). Ainsi, l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame par les  $\beta$ -lactamases empêche les  $\beta$ -lactamines de se fixer de façon covalente (acylation) sur le site actif des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, les protéines liant la pénicilline (PLP).

De la même façon, les aminosides peuvent perdre leur capacité à se fixer sur leur cible, le ribosome, lorsque certaines de leurs fonctions -OH ou -NH<sub>2</sub> sont modifiées par des enzymes bactériennes stéréospécifiques (phospho-transférases, nucléotidyl-transférases, acétyl-transférases). Certaines de ces enzymes sont acquises par les bactéries pathogènes à l'occasion d'échanges génétiques avec des espèces environnementales. D'autres, en revanche, ont une origine intrinsèque et une fonction physiologique sans lien direct avec la résistance.

Un exemple supplémentaire de ce type de stratégie est illustré par l'ADP-ribosyl-transférase Arr-2 dont le gène, porté par un intégron de type 1, confère un haut niveau de résistance à la rifampicine chez différents bacilles à Gram négatif.

La fosfomycine, elle aussi, est la cible de diverses enzymes dont les métallo-glutathion transférases FosA, FosB ou FosX qui catalysent l'ouverture de son cycle époxy et la formation d'un adduit glutathion-fosfomycine inactif. Les gènes de ces enzymes sont, là encore, véhiculés par des plasmides ou des transposons (Tn2921, par exemple) mais peuvent parfois appartenir au patrimoine de l'espèce comme c'est le cas chez *P. aeruginosa* (locus PA1129)

### **3.3.2 Modification de la cible**

#### **- Enzymatique**

Un mécanisme fréquemment utilisé par les bactéries pour se soustraire à l'action des antibiotiques revient à produire des enzymes qui, en modifiant les cibles cellulaires, leur font perdre leur affinité pour les agents anti-infectieux. Dans le cas des macrolides,

lincosamides et streptogramines B (groupe MLS<sub>B</sub>), la méthylation enzymatique de certains résidus adénine (par exemple A2058 chez *E. coli*) de l'ARN 23S empêche ces antibiotiques de se positionner correctement dans le domaine peptidyl-transférase et de bloquer la progression du néo-peptide dans le tunnel de sortie du ribosome. Les méthylases Erm (pour *Erythromycin ribosome methylases*) responsables de cette résistance croisée (phénotype MLS<sub>B</sub>) sont codées par des gènes souvent mobiles dont l'expression peut être induite à différents niveaux par les MLS<sub>B</sub> ou rendue constitutive par des mutations en amont de leur séquence.

Plus récemment, un autre processus de modification enzymatique du ribosome a été mis en évidence chez des bactéries résistantes aux aminosides. La méthylation de l'ARN 16S en position G1405 par des enzymes dénommées ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD et RmtE codées par des gènes plasmidiques localisés dans des transposons s'est avérée, là aussi, prévenir la fixation des antibiotiques sur leur cible et abolir totalement leur action antibactérienne. La résistance de haut niveau résultant de cette modification constitue une menace potentielle pour l'avenir des aminosides car elle affecte la presque totalité des membres de cette importante famille thérapeutique et tend à diffuser au sein des espèces à Gram négatif.

### - **Mutationnelle**

La résistance aux antibiotiques peut résulter de mutations spontanées qui, en introduisant des substitutions d'acides aminés ou de bases nucléiques dans les cibles moléculaires, leur font perdre leur affinité pour les agents inhibiteurs. De nombreux exemples de ce type de mécanismes ont été rapportés dans la littérature pour différentes familles d'antibiotiques. Toutefois, le phénomène ne peut apparaître facilement que lorsque la cible est codée par un gène se trouvant en une seule, voire deux copies dans le chromosome. Des mutations isolées affectant les gènes de structure des ARN 16S et 23S ne peuvent aboutir à une résistance significative aux antibiotiques inhibant la synthèse protéique que chez les espèces ayant un faible nombre de copies de ces gènes car les altérations sont récessives par rapport aux allèles sauvages. C'est pourquoi la résistance par altération des ARN ribosomiaux est observée principalement chez la tétracycline, les macrolides, les aminosides et plus rarement chez MLS<sub>B</sub>, kétolides.

La sensibilité aux  $\beta$ -lactamines peut être diminuée par des mutations ou des réarrangements génétiques touchant les PLP. Cette résistance, qualifiée de « non enzymatique » pour rappeler qu'elle ne dépend pas de la production de  $\beta$ -lactamase, a été largement documentée chez *S. pneumoniae* (altération des PLP1a, PLP2b, PLP2x) et

*Haemophilus influenzae* (PLP3) mais a été constatée également chez d'autres espèces comme *Streptococcus pyogenes* (PLP2a', PLP5 chez des mutants de laboratoire uniquement), *E. faecium* (PLP5), *N. gonorrhoeae* (PLP1, PLP2), *N. meningitidis* (PLP2), *H. pylori* (PLP1). *Listeria monocytogenes* (PLP3) ou *P. mirabilis* (PLP2). La résistance résultant de ces altérations varie suivant les bactéries, la nature des modifications (types de mutations sur- ou sous-expression des protéines concernées et l'affinité spécifique des  $\beta$ -lactamines pour les différentes PLP.

Le principal mécanisme de résistance aux 4-quinolones implique, là encore, des altérations dans les cibles, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces deux enzymes tétramériques, qui interviennent respectivement dans la réplication de l'ADN et le désenchevêtrement des chromosomes au cours de la division cellulaire, sont constituées chacune de deux sous-unités : GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase, ParC et ParE pour la topoisomérase IV. Diverses mutations dans les gènes codant ces sous-unités (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) ont été identifiées chez des souches résistantes. Leur impact sur les CMI des quinolones varie selon la nature et le nombre des substitutions en acides aminés qu'elles engendrent, la nature et le nombre de sous-unités qu'elles affectent et les espèces bactériennes concernées. L'altération d'une région bien précise de ces sous-unités, appelée QRDR (Quinolone Resistance Determining Region), empêche les molécules de quinolones chez les bactéries à Gram négatif et la topoisomérase IV celle chez les bactéries à Gram positif.

La résistance à la rifampicine (altération de la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase, *RpoB*), au triméthoprime (dihydrofolate reductase, DHFR), à l'INH (NADH-enoyl-ACP réductase, *InhA* ;  $\beta$ -céto-ACP synthétase) ou à l'acide fusidique (facteur d'élongation EF-G) sont des exemples parmi d'autres d'altérations des cibles identifiées chez des mutants cliniques.

### 3.3.3 Séquestration de l'antibiotique, protection de la cible

Lorsqu'il n'existe pas de solution efficace pour inactiver l'antibiotique ou diminuer l'affinité de la cible, les bactéries peuvent être contraintes de séquestrer l'agent inhibiteur pour en neutraliser les effets. Cette stratégie a été évoquée pour tenter d'expliquer la résistance aux céphalosporines de troisième génération (C3G) chez les mutants « déréprimés » de certains bacilles à gram négatif surproduisant la céphalosporinase « chromosomique » *AmpC*, en raison de la relative stabilité de ces  $\beta$ -lactamines vis-à-vis de l'enzyme. Les antibiotiques seraient ainsi neutralisés dans des complexes stables avec

la  $\beta$ -lactamase en excès et ne seraient plus en concentration suffisante pour saturer les PLP.

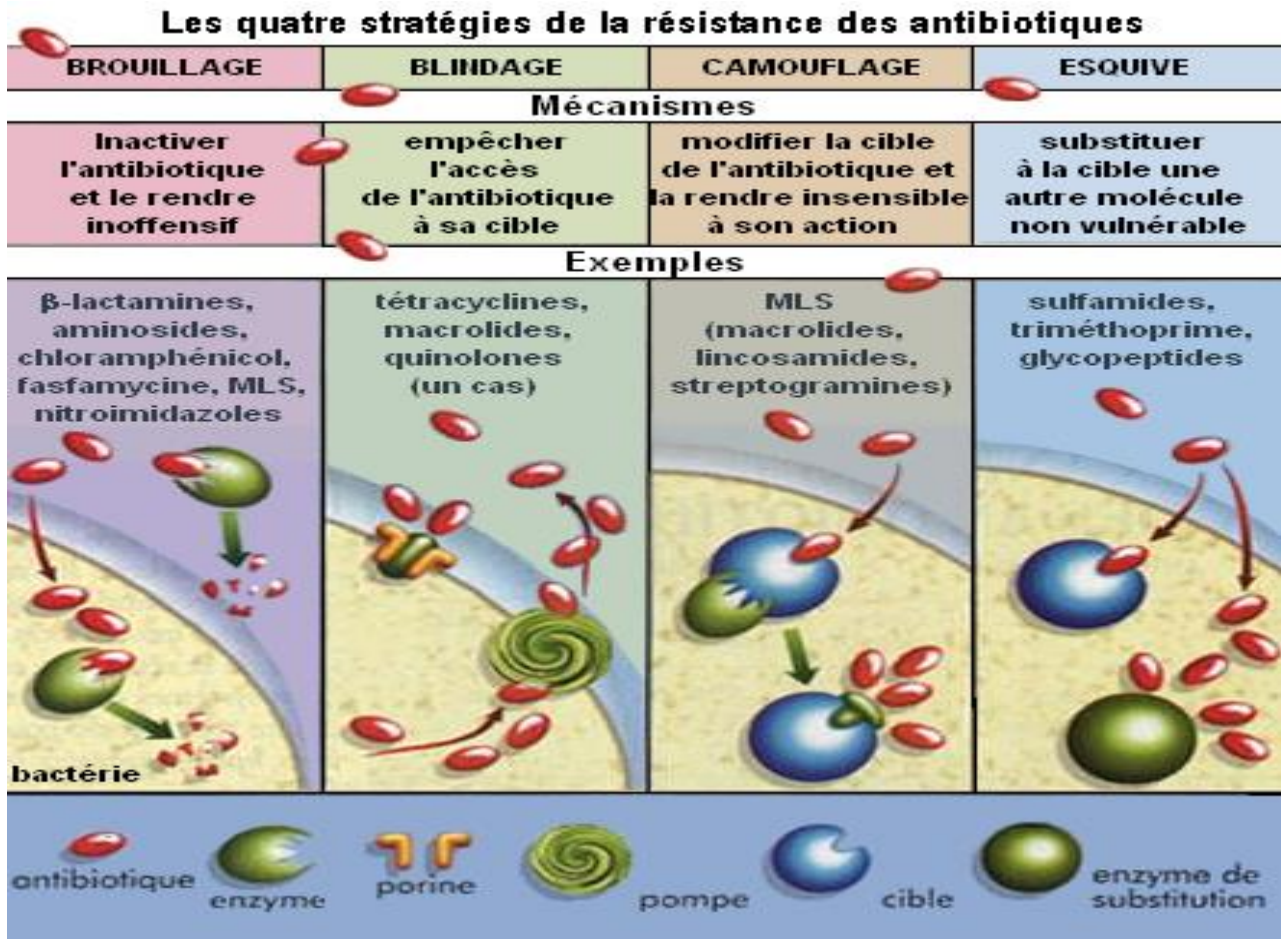
### **3.3.4 Baisse de la perméabilité membranaire/ imperméabilité**

A l'exception des polymyxines et peut être des aminosides, les antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif traversent la membrane externe par diffusion passive à travers les porines. La diminution quantitative ou des modifications dans la région de constriction interne de ces canaux protéiques peuvent freiner la pénétration intracellulaire des agents antibactériens et conférer de ce fait, un bas niveau de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques.

### **3.3.5 Efflux**

Un processus assez répandu dans le monde vivant pour maintenir l'homéostasie cellulaire consiste à refouler de façon active les agents nocifs dans le milieu extérieur ; ces systèmes d'efflux, encore appelés « pompes », ont été mis en évidence dans les années 80 par Stuart Levy chez des souches de *E. coli* résistantes à la tétracycline. De très nombreux autres transporteurs ont été identifiés depuis chez presque toutes les espèces bactériennes. Ces altérations constituent souvent un appoint non négligeable dans la résistance à certains agents car elles potentialisent les mécanismes émonctoires (production d'enzymes inactivatrices notamment).





**Figure 2** : stratégies de la résistance des antibiotiques (Source: mutation bactérienne-unBlog.fr Juin 2018).



**Tableau I : principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (16)**

Antibiotiques	Mécanismes	Fréquence
Bêta-lactamines	Inactivation enzymatique	+++
	Altération de cible	+++
	Cible supplémentaire	+++
	Efflux actif	++
	Imperméabilité membranaire	++
Aminosides	Inactivation enzymatique	+++
	Altération de cible	+
	Modification de cible	+/-
	Imperméabilité membranaire	+/-
	Efflux actif	++
	Séquestration	+/-
Macrolides et apparentés	Modification de cible	+++
	Efflux actif	++
	Altération de cible	+
	Inactivation enzymatique	+/-
Oxazolidinones	Altération de cible	+/-
	Modification de cible	+/-
Glycopeptides	Modification de cible	+/-
	Séquestration de l'antibiotique	+/-
Quinolones	Altération de cible	+++
	Efflux actif	++
	Protection de la cible	+
	Inactivation enzymatique	+
Tétracyclines	Efflux actif	+++

	Protection de la cible	+++
	Inactivation enzymatique	+/-
Phénicolés	Inactivation enzymatique	++
	Efflux actif	++
Rifampicine	Altération de cible	++
	Inactivation enzymatique	+/-
Fosfomycine	Imperméabilité membranaire	++
	Inactivation enzymatique	+/-
Isoniazide, éthionamide	Défaut d'activation enzymatique	+
	Altération de la cible	+
Pyrazinamide	Défaut d'activation enzymatique	+
Métronidazole	Défaut d'activation	+/-
	Inactivation enzymatique	+/-
Triméthoprime	Altération de la cible	++
	Amplification de la cible	+
Sulfamides	Altération de la cible	++
Polymyxines	Imperméabilité membranaire	+/-
	Altération de la cible	+/-

(+/-) : rare, (+) : peu fréquent, (++) : fréquent, (+++) : très fréquent

Source : Patrick P. Biochimie de la résistance. Dans: Antibiogramme. 3<sup>e</sup> éd. Paris: ESKA; 2012. p. 17- 23.

## **3.4 Bactéries multi-résistantes**

### **3.4.1 Définition**

Les bactéries sont dites multi-résistantes aux antibiotiques (BMR) lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique. La multi-résistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. La multi-résistance concerne les bactéries responsables d'infections communautaires (ex : pneumocoques, bacilles de la

tuberculose) et les bactéries responsables d'infections nosocomiales (IN) ou associées aux soins (17).

### 3.4.2 Les principales bactéries multi-résistantes

**Tableau II** : principales bactéries multi-résistantes (18).

Priorité 1 : CRITIQUE
<i>Acinetobacter baumannii</i> , résistance aux carbapénèmes <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , résistance aux carbapénèmes <i>Enterobacteriaceae</i> , résistance aux carbapénèmes et aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération
Priorité 2 : ELEVEE
<i>Enterococcus faecium</i> , résistance à la vancomycine <i>Staphylococcus aureus</i> , résistance à la méticilline, résistance intermédiaire ou complète à la vancomycine <i>Helicobacter pylori</i> , résistance à la clarithromycine <i>Campylobacter</i> , résistance aux fluoroquinolones <i>Salmonella spp.</i> Résistance aux fluoroquinolones <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , résistance aux céphalosporines de 3 <sup>ème</sup> génération, résistance aux fluoroquinolones
Priorité 3 : MOYENNE
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , insensible à la pénicilline <i>Haemophilus influenzae</i> , résistance à l'ampicilline <i>Shigella spp.</i> , résistance aux fluoroquinolones

Source : Liste OMS des agents pathogènes prioritaires pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques

### **3.4.3 Principaux facteurs d'émergence des BMR en Afrique de l'ouest**

- Les conditions socio-économiques ;
- Le manque de ressources humaines qualifiées ;
- Le manque d'infrastructure pour le diagnostic étiologique et l'évaluation de la résistance aux antibiotiques ;
- L'absence de réseaux nationaux et régionaux de surveillance de la résistance ;
- L'usage inapproprié et la filière non sécurisée des antibiotiques (19).

### **3.4.4 Conséquences de la multi-résistance**

#### **Dans le domaine de la santé :**

Durée plus longue de la maladie,

Hausse de la mortalité,

Hospitalisation prolongée,

Protection affaiblie lors d'une intervention chirurgicale ou d'autres actes médicaux.

Augmentation des coûts,

#### **Dans l'agriculture, l'élevage et l'industrie alimentaire :**

La perte d'antimicrobiens efficaces permettant de traiter les animaux malades nuit à la production alimentaire et porte atteinte au revenu familial.

L'exposition aux cultures traitées par des agents antimicrobiens ou contaminées par du fumier ou du lisier et la contamination des eaux souterraines par des eaux de ruissellement provenant d'exploitations agricoles.

La résistance aux antimicrobiens grève lourdement l'économie mondiale du fait des pertes économiques liées à la baisse de la productivité provoquée par la maladie (de l'homme et de l'animal) et à l'augmentation du coût des traitements (20).

### **3.5 Entérobactéries**

Le nom d'entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux (21).

La famille des entérobactéries est la plus grande et la plus hétérogène collection de bactéries d'importance médicale à Gram négatif. Plus de 50 genres et des centaines d'espèces ont été décrits.

Les entérobactéries sont des organismes omniprésents dans le monde entier dans le sol, l'eau et la végétation et font partie de la flore intestinale normale de la plupart des animaux, dont un quart à un tiers de toutes les bactériémies (22).

Depuis plus de 20 ans la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (C3G) ne cesse d'augmenter notamment par l'acquisition de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) (23).

### **3.6 *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* est largement distribué dans la nature et est généralement présent dans les environnements humides dans les hôpitaux. Il peut coloniser des humains normaux, chez qui c'est un saprophyte (24).

*P. aeruginosa* est l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes. Les individus avec des défenses de l'hôte intactes ne sont pas à risque d'infection grave avec *P. aeruginosa*, mais les hôtes immunodéprimés sont à risque d'infection invasive. Il peut donner lieu à divers types d'infections : méningites, infections pulmonaires, infections urinaires, infections ostéoarticulaires, infections oculaires, infections ORL, infections cutanées et septicémies (25).

### **3.7 *Acinetobacter baumannii* Complexe**

Le genre *Acinetobacter* est strictement aérobie, Cocco bacillaire à Gram négatif, généralement nitrate négatif, et non fermentatif. *A. baumannii* est l'espèce la plus souvent responsable des infections à l'hôpital (26).

*A. baumannii* est retrouvé au sein de la flore cutanée commensale de 25% des individus. Après leur entrée dans des services de soins intensifs les patients sont rapidement colonisés au niveau de la gorge, des nases et du tube digestif.

*Acinetobacter* peut se développer dans des solutions antiseptiques, dans des savons liquides et coloniser les appareils médicaux, les mobiliers, les souches peuvent être véhiculées par le personnel (27).

## **4 Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques (28)**

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

### **4.1 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 « sauvages » et sont naturellement sensibles aux aminopénicillines, carboxy-pénicillines, uréïdopénicillines, 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, uréïdopénicillines, à l'aztréonam, aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Cependant, elles produisent à très bas niveau une céphalosporinase chromosomique non inductible de type AmpC (groupe fonctionnel 1) qui peut entraîner, chez certaines souches, une réduction de sensibilité aux aminopénicillines, à leurs associations au clavulanate et/ou aux C1G.

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

### **Groupe 2 : phénotype « pénicillinase de bas niveau »**

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

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

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

Règles de lecture interprétative : La résistance aux pénicillines et tout particulièrement aux uréidopénicillines, peut être de bas niveau. Tous les résultats « sensibles » doivent être interprétés « 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 de 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.

### **4.2 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*.



### 4.3 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.

### 4.4 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, triméthoprim, 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 (21).

## 5 Sensibilité des Bacilles à Gram négatif non fermentaires aux antibiotiques (29)

**A. baumannii** : aminopénicillines, aztréonam, aminopénicillines + inhibiteur de bêta-lactamase, céphalosporines 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, céfotaxime ceftriaxone, ertapénème, chloramphénicol, triméthoprim, fosfomycine.

**P. aeruginosa** : aminopénicillines, aminopénicillines + inhibiteur de bêta-lactamase, céphalosporines 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, céfotaxime ceftriaxone, ertapénème, chloramphénicol, triméthoprim, triméthoprim-sulfaméthoxazole,

## **6 Matériel et Méthodes.**

### **6.1 Cadre de l'étude**

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) a constitué notre cadre d'étude. 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 à la suite de 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.

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

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

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

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

## 6.2 Type d'étude

Etude transversale, rétro-prospective de toutes les BMR (entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* Complexe) isolées au LRM.

## 6.3 Période d'étude

L'étude s'est déroulée de janvier 2016 à décembre 2017.

## 6.4 Population d'étude

La population de l'étude correspond à l'ensemble des souches d'entérobactéries, de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Acinetobacter baumannii* Complexe, multi-résistant isolées au LRM et ayant fait l'objet d'un antibiogramme.

### - Critères d'inclusion

Ont été inclus dans cette étude toutes les souches :

Entérobactéries résistantes à au moins deux familles d'antibiotiques.

Tous les *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* Complexe également résistants à au moins deux familles d'antibiotiques.

### - Critères de non inclusion

Les bacilles à Gram négatifs autres que les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* n'ont pas été incluses dans notre étude.

N'étaient pas également incluses dans notre étude les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* pour lesquels les familles d'antibiotique essentiellement actifs sur eux n'étaient pas testées.

## 6.5 Collecte de données

Les données ont été recueillies à partir de la base de données interne du laboratoire (CODATEC) qui donne des informations sur :

- La date de prélèvement
- L'âge des patients,
- Le sexe,
- La provenance des patients.
- La nature du prélèvement,

- Les bactéries isolées,
- Les résultats des antibiogrammes réalisés
- Les types de résistance

## 6.6 Méthodes

Au cours de notre étude nous nous sommes intéressés aux différentes techniques de l'antibiogramme des bactéries à Gram négatifs au LRM.

### 6.6.1 Antibiogramme

#### 6.6.1.1 Définition et principe

L'antibiogramme est fondé sur l'inhibition in vitro de la croissance d'une bactérie par un antibiotique. Il consiste à mesurer sur une souche bactérienne responsable d'une infection, une concentration active d'antibiotique choisie pour des raisons pratiques comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) afin de la classer dans 3 catégories cliniques sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) dont la signification repose sur des critères d'efficacité thérapeutique (CA-SFM/ EUCAST) (30).

#### 6.6.1.2 Technique par diffusion sur gélose

##### Matériels

- Densitomètre ou étalons de turbidité (échelle de 0,5 Mac Farland)
- Ecouvillons stériles
- Pipettes Pasteurs
- Boîtes de Pétri (carrée à 120mm ou ronde à 90 mm) pré coulé avec de la gélose de Mueller Hinton
- Tubes à vis contenant 10ml d'eau physiologique
- Tubes à hémolyse
- Agitateur type vortex
- Eau physiologique 0,9%
- Applicateur de disque ou pinces
- Règle

##### Préparation de l'inoculum

- Une colonie de 18- 24 heures si c'est une entérobactérie ou Pseudomonas émulsionner dans 2ml d'eau physiologique est agitée au vortex
- Ajuster la densité de l'inoculum à 0.5 Mc Farland ( $10^8$  UFC/ml) à l'œil nu ou grâce à un densitomètre.

La dilution de l'inoculum est faite au 1/10 (1ml dans 10ml d'eau physiologique pour obtenir une turbidité de  $10^7$ UFC).

## Ensemencement des boîtes

- Sécher les boîtes de milieu MH à l'étuve à 37°C
- Tremper un écouvillon stérile sec dans l'inoculum
- Eliminer l'excès en pressant l'écouvillon contre les parois du tube
- Ensemencer en stries sur toute la surface du Milieu à trois reprises en tournant à chaque fois la boîte de 60°C
- Passer ensuite l'écouvillon sur le bord de la gélose

Les disques sont posés à l'aide d'une paire de pinces stériles ou d'un distributeur de disque une distance de 25 à 30 mm est laissée entre les disques :

- Sur une boîte de pétri de 90 mm de diamètre (maximum 7 disques/ boîte),
- Ou sur une boîte carrée de 120 x 120 mm, (maximum 16 disques/boîte).

Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte. On appuie doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Un disque placé ne doit plus être bougé en raison de sa diffusion rapide dans la gélose.

## Incubation

Les boîtes sont incubées en aérobie à 37 °C dans les 30 minutes qui suivent l'ensemencement pendant 18 à 24h.

## Lecture

Le diamètre d'inhibition autour de chaque disque est mesuré à l'aide d'une règle. Les mesures doivent être effectuées sur la face inférieure de la boîte, sans ouvrir le couvercle.

Les résultats sont interprétés en sensible (S) Intermédiaire (I) ou résistant (R) selon les normes du CA-SFM, version 2017.

### 6.6.1.3 Antibiogramme sur automate

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 sur le plan clinique. Le système comprend l'instrument Vitek® 2 Compact, un ordinateur et une imprimante.



**Figure 3** : automate VITEK® 2 Compact (Photo prise au LRM le 13/03/18)

### **Préparation de la solution pour antibiogramme**

Si la bactérie est de Gram négatif, on utilise la micropipette calibrée à 145 $\mu$ l (rouge). A partir de la suspension bactérienne préalablement préparée, pipeter et faire une dilution dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin au tube d'identification de la bactérie. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.

On Place la carte pour antibiogramme AST-N222 pour les bacilles à Gram négatif non-fermentatifs et AST-N233 pour les entérobactéries.

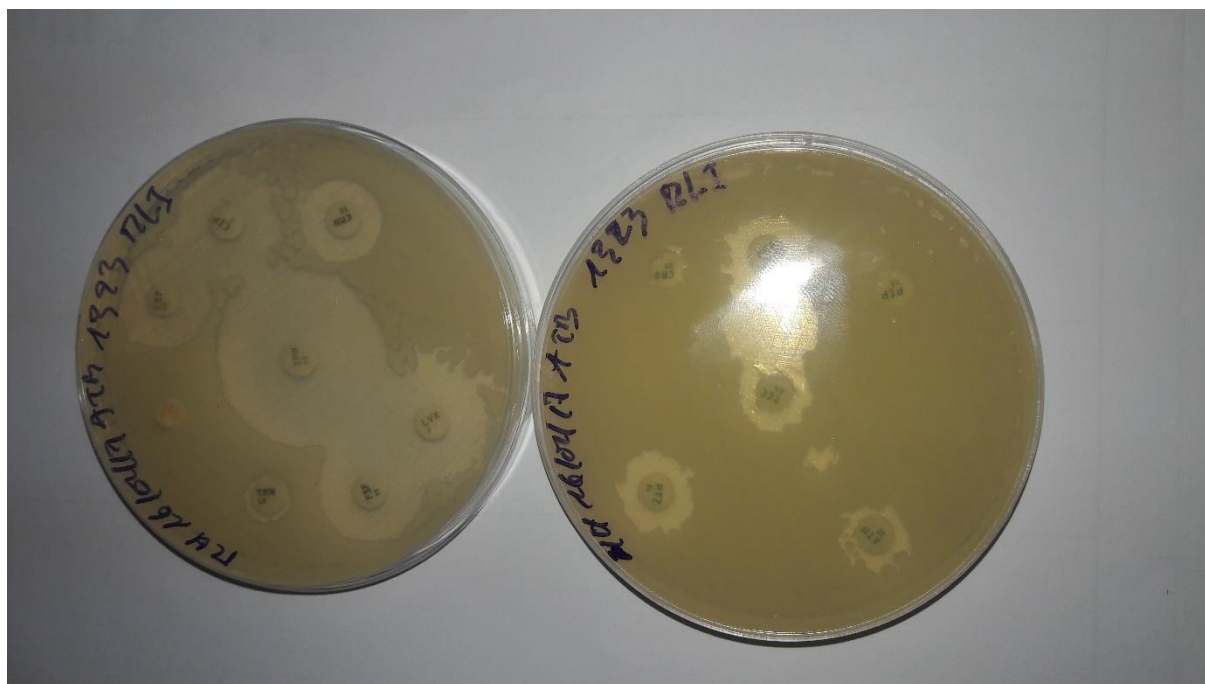
L'antibiogramme de VITEK® 2 Compact fait appel à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Il permet d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle puis la sensibilité naturelle du germe.

#### **6.6.1.4 Détection de bactérie producteur BLSE**

Le phénotype bêta-lactamase à spectre étendu est défini uniquement sur la gélose Mueller-Hinton. Sur une boîte de gélose de MH préalablementensemencée on place entre les disques de C3G ou C4G (céfotaxime= CXT et/ou ceftazidime=CAZ) un disque d'amoxicilline+ acide clavulanique= AMC. L'apparition d'une zone d'inhibition dite en bouchon de champagne entre un des disques de C3G/C4G et l'AMC confirme la présence



d'une BLSE. En l'absence d'image de synergie, la production de BLSE sera suspectée devant toute diminution  $\emptyset$  d'inhibition autour des C3G : CTX  $\leq$  27 mm, CAZ  $\leq$  22 mm, CRO  $\leq$  25 mm, ou de monobactam : aztréonam  $\leq$  27 mm .



**Figure 4 :** image de BLSE prise au LRM (13/03/18)

**Tableau III** : antibiotiques testés sur les Entérobactéries (29)

Familles d'antibiotique	Molécules d'Antibiotiques	Charges du disque (µg)
Bêta-lactamines	Amoxicilline,	20
	Amoxicilline +acide clavulanique,	20-10
	Ticarcilline,	75
	Pipéracilline	30
	Céfalotine,	30
	Céfoxitine,	30
	Céfotaxime,	5
	Ceftazidime,	10
	Imipenème	10
Aminosides	Tobramycine,	10
	Gentamicine,	10
	Amikacine	30
Quinolones	Acide nalidixique,	30
	Péfloxacine ou Norfloxacine,	5/10
	Ciprofloxacine	5
Autres	Cotrimoxazole,	1.25-23.75
	Fosfomycine,	200
	Nitrofurantoines	100



**Tableau IV** : antibiotiques testés sur le BGNnF (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* complexe) (29)

Familles d'antibiotique	Antibiotiques	Charge du disque ( $\mu\text{g}$ )
Bêta-lactamines	Ticarcilline +/- IBL,	75-10
	Pipéracilline +/- IBL	30-6
	Céfépime,	30
	Ceftazidime,	10
	Imipénème	10
	Aztréonam	30
Aminosides	Tobramycine,	10
	Gentamicine,	10
	Amikacine	30
Quinolones	Ciprofloxacine	5
Autres	Triméthoprimé-sulfaméthoxazole,	1,25-23,75
	Colistine,	50
	Fosfomycine	200

### 6.6.2 Technique de souchothèque

#### - Principe

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

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

#### - Matériel

Portoir tube  
Tube à hémolyse  
Micropipettes  
Embouts  
Cryotubes  
Tubes à vis  
Marqueur

Congélateur (-80°C)

- **Réactifs**

Glycérol

Milieu Mueller Hinton ou BCC ou TCS.

- **Nature du prélèvement**

Souche pure des bactéries.

- **Enregistrement**

Cahier de souchothèque et fichier électronique.

- **Technique**

### **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 conserver ;

Prendre le milieu Mueller 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 première 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.

### **Conservation courte durée**

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

## **6.7 Analyse et traitement des données**

Les données ont été saisies sur le logiciel Word 2016 et analysées sur EPI INFO™ version 7.2.1.0 français. Les figures et tableaux ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel 2016.

## 7 Résultats

### 7.1 Pourcentage des BMR à Gram négatif isolées au cours de 2016-2017 au LRM

Sur 534 antibiogrammes réalisés sur les bactéries à Gram négatif de 2016-2017, 152 (22%) étaient des bacilles multi-résistants (figure 5).

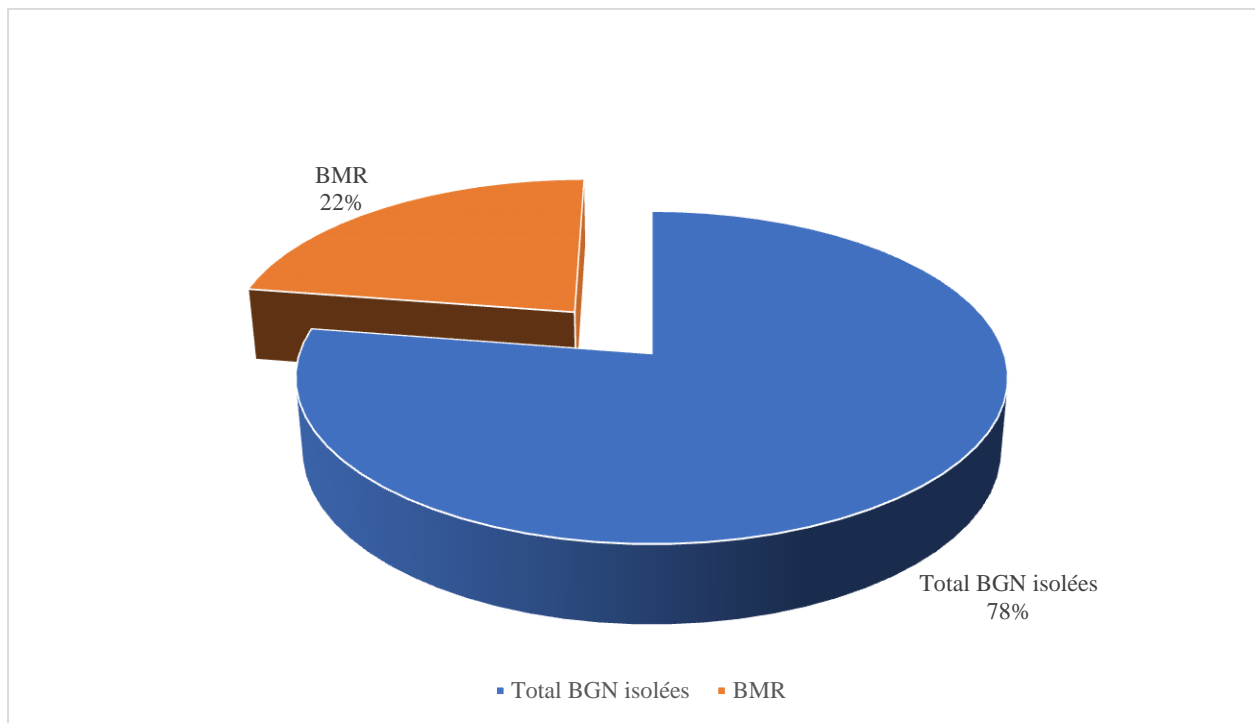


Figure 5 : prévalence des BMR au LRM

### 7.2 Types de prélèvement

Tableau V : prévalence des bacilles multi-résistants selon la nature du prélèvement

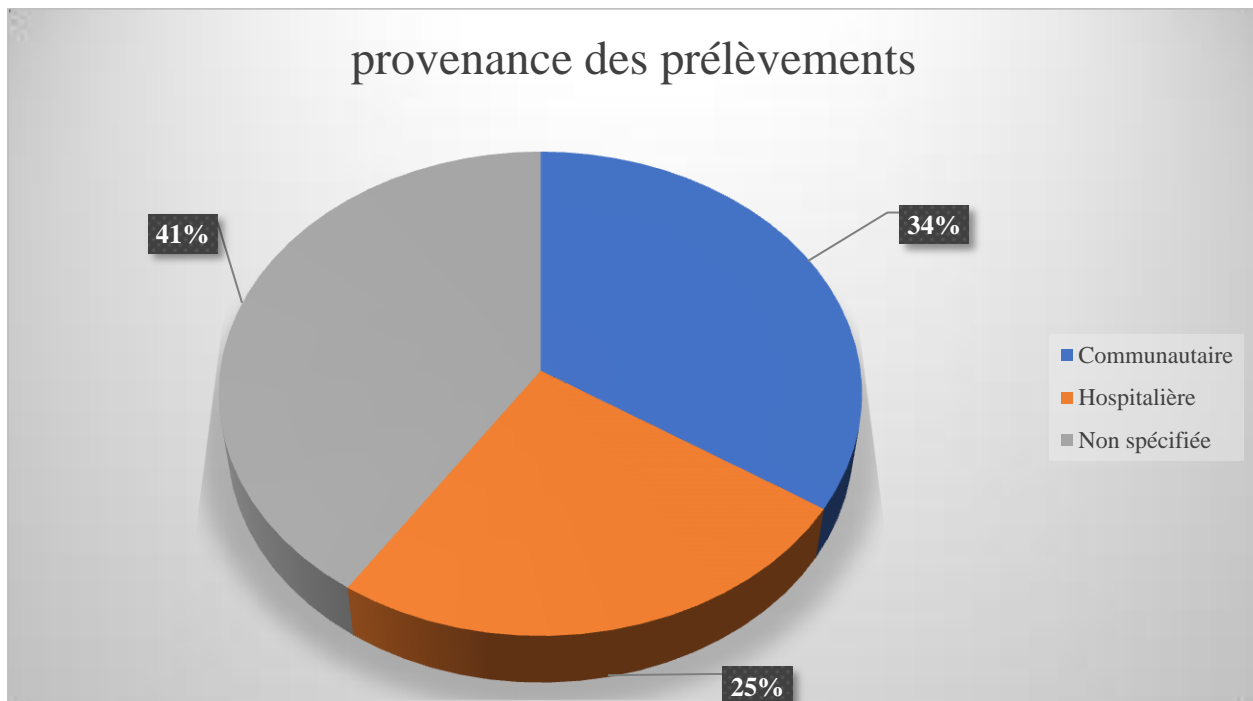
Nature du prélèvement	Prélèvements positifs	Prélèvements à BMR fermentaire	Prélèvements à BMR non fermentaire	Taux des BMR
Urine	215	74	3	35,81
Pus	201	46	12	28,85
Hémoculture (sang)	31	11	2	41,93
Liquide d'ascite	15	4	0	26,67
Autres	72	0	0	0
<b>Total</b>	<b>534</b>	<b>135</b>	<b>17</b>	<b>22%</b>

**Autres** : prélèvement vaginal, selle, Prélèvement urétral

Les BMR ont été principalement isolés dans les hémocultures avec un taux de 41,93%. Dans les urines ils ont représenté 35,81%, les pus et liquide d'ascite avaient respectivement 28,85 et 26,67%.

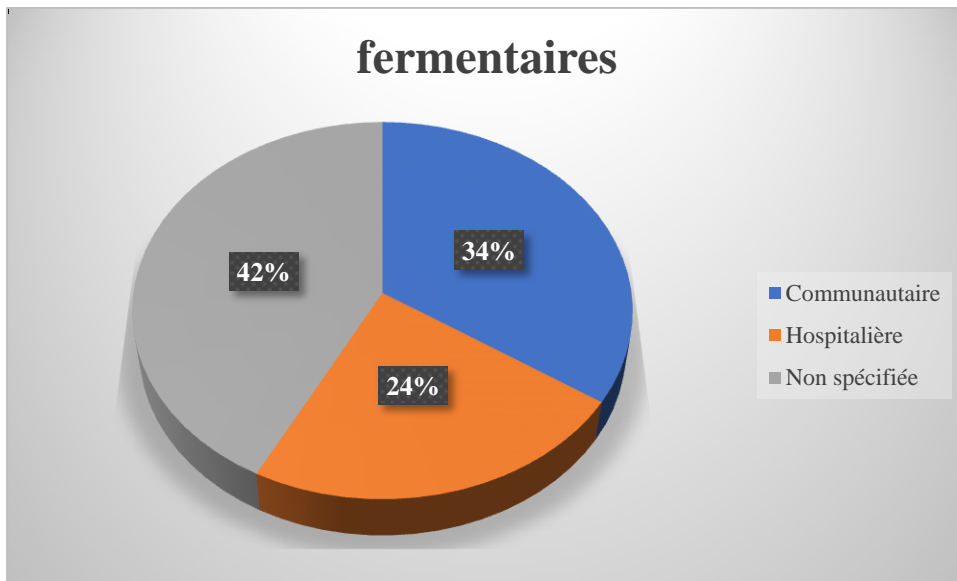
### 7.3 Répartition des échantillons selon la provenance

Les BMR étaient plus isolées dans les prélèvements d'origine communautaire avec un taux de (34 %) ; les BMR d'origine hospitalière étaient à (25%) et (41%) des prélèvements étaient de provenance non spécifiée.



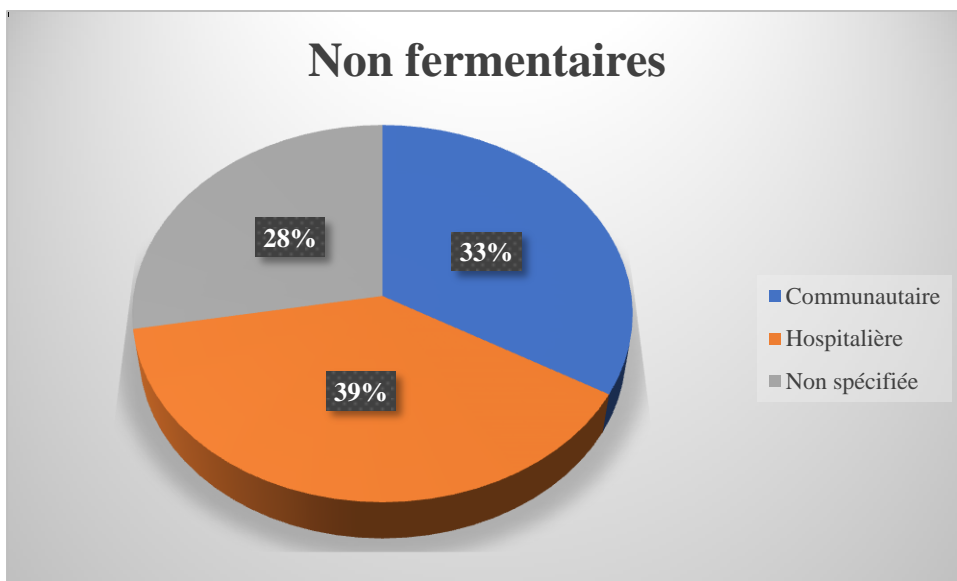
**Figure 6** : répartition des BMR selon la provenance des prélèvements

Les BMR fermentaires ont représenté (34%) en communauté contre (24%) en milieu hospitalière.



**Figure 7** : répartition des BMR fermentaires selon la provenance des prélèvements

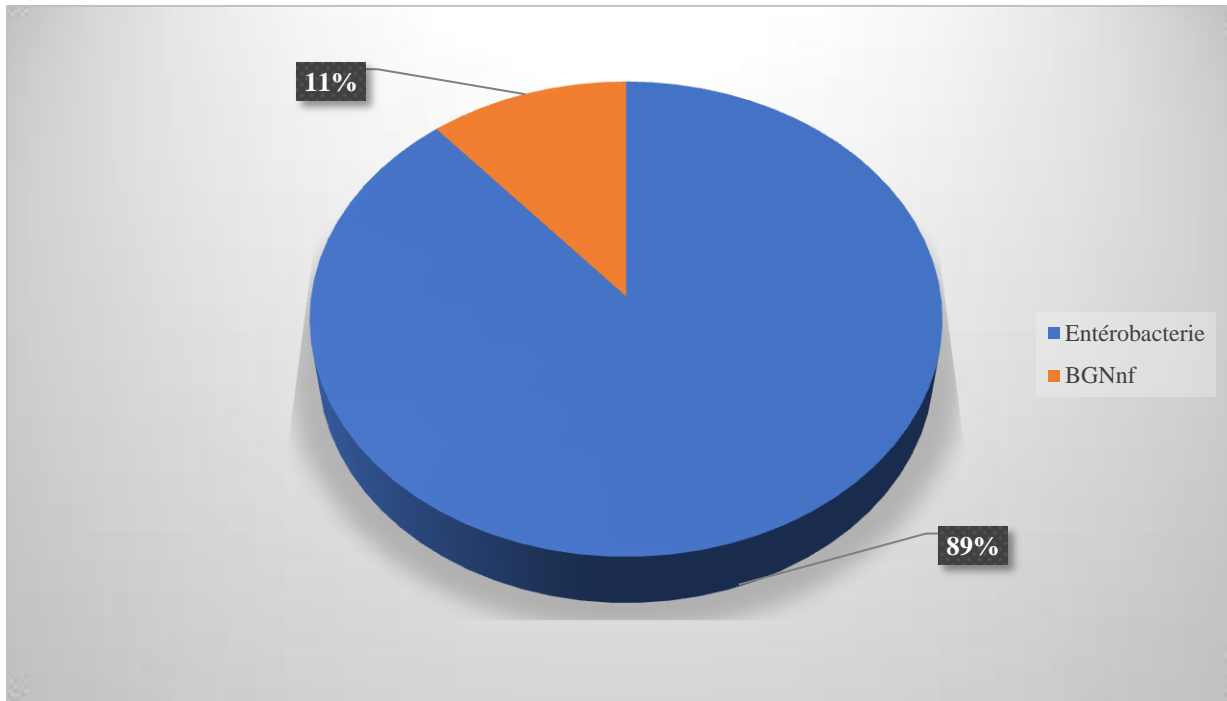
Les BMR non fermentaires ont représenté (33%) en communauté contre (39%) en milieu hospitalière.



**Figure 8** : répartition des BMR non fermentaires selon la provenance des prélèvements

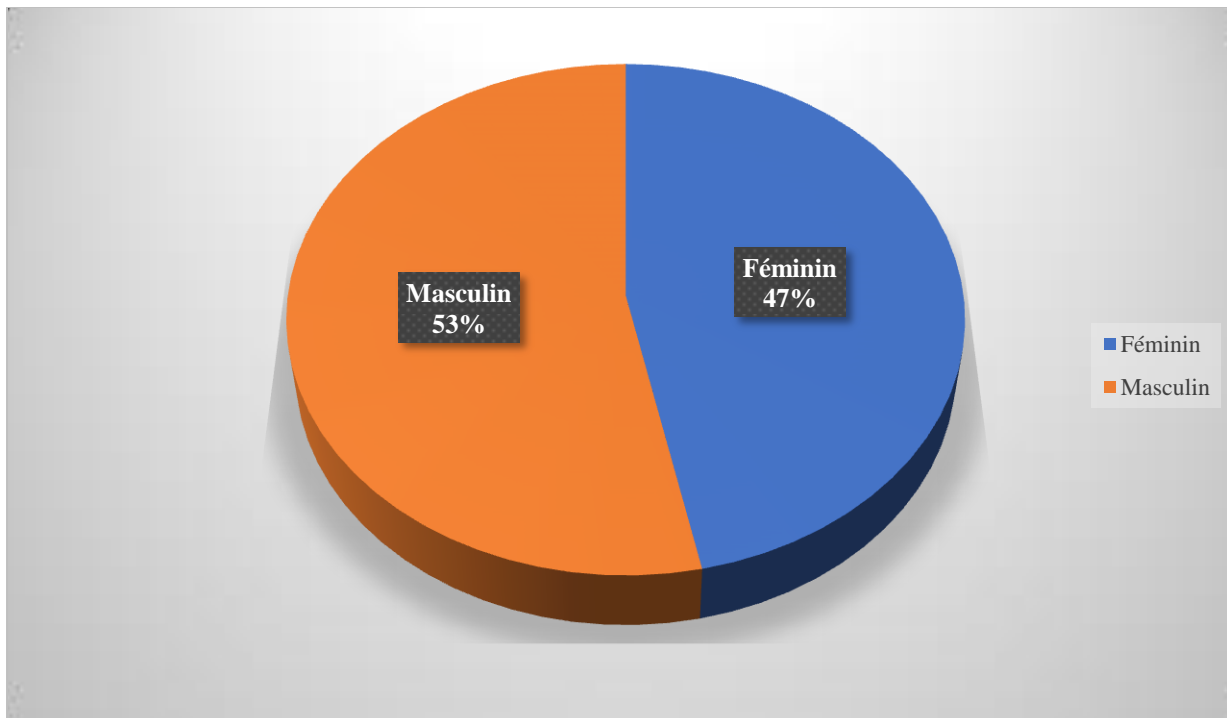
#### 7.4 Répartition des bacilles multi-résistants isolées par groupe bactérien

Sur un total de 152 BMR isolées 135 (89%) étaient des entérobactéries et 17(11%) étaient des BGNnF



### 7.5 Répartition des BMR selon le sexe des patients

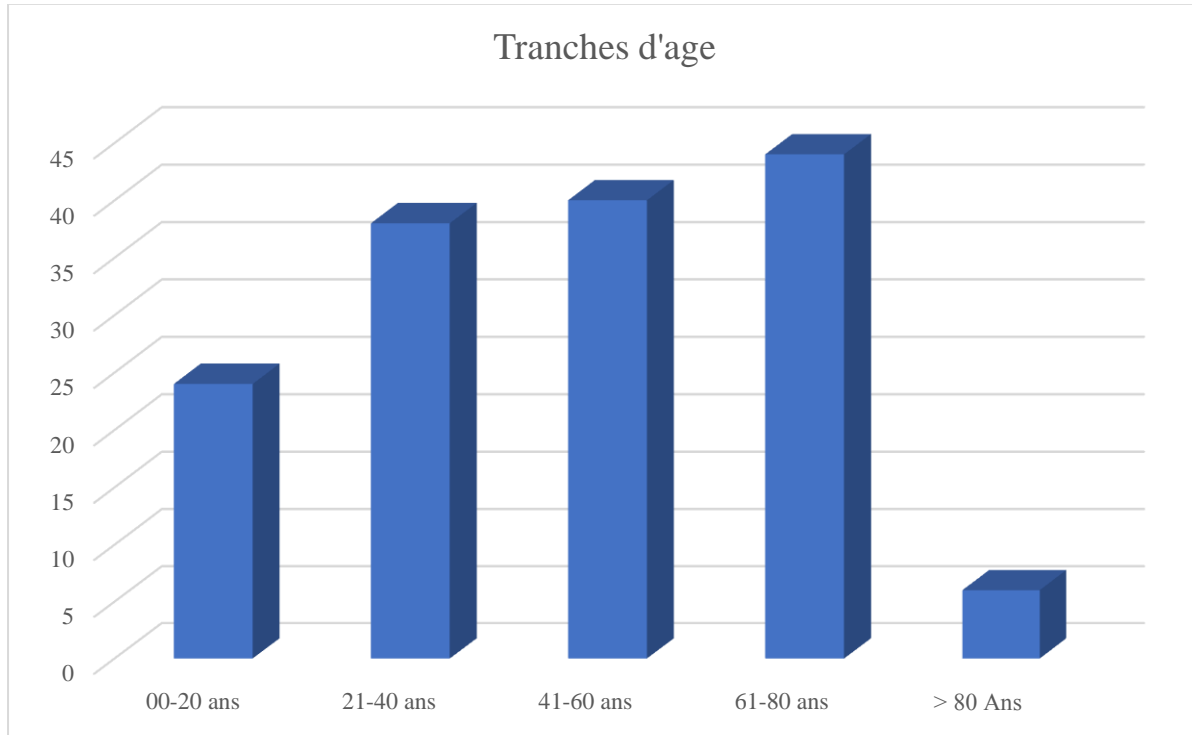
Le sexe masculin était le plus représenté avec 53% de taux contre 47% pour le sexe féminin



**Figure 9** : répartition des BMR selon le sexe des patients prélevés.

### 7.6 Répartition des BMR selon la Tranche d'âge

La tranche d'âge de [61-80] ans a été la plus représentée avec (28,38%) de cas de multi-résistance.

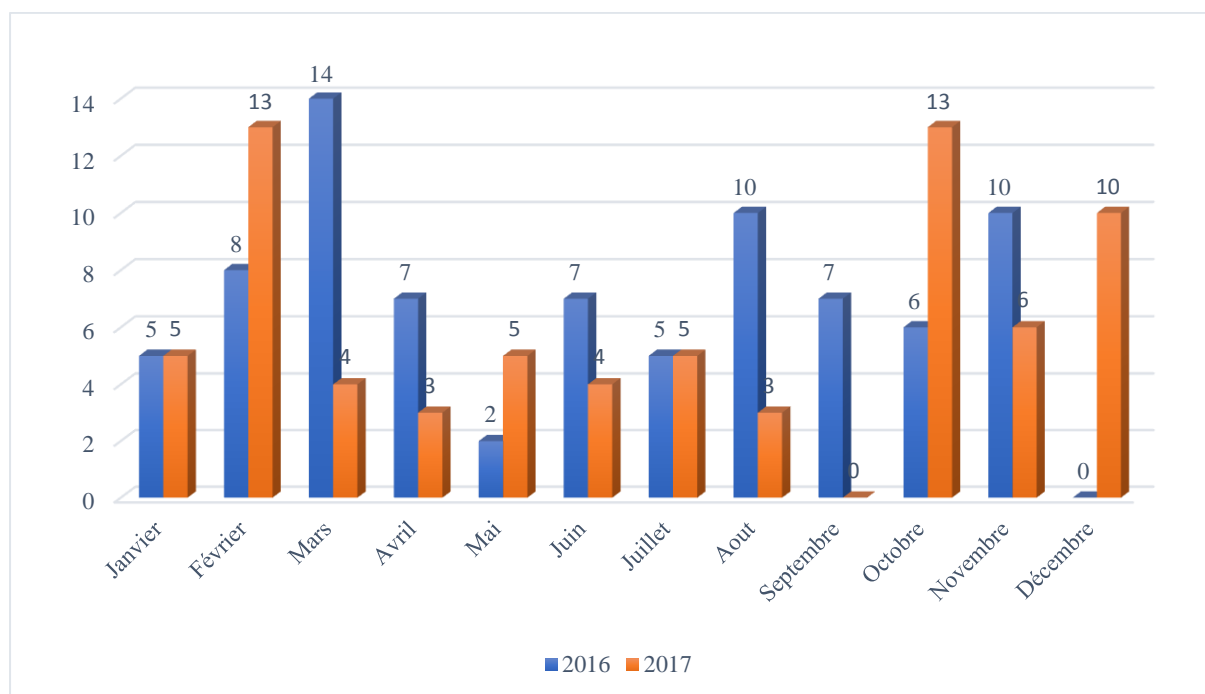


**Figure 10** : répartition des BMR isolées selon la tranches d'âge

### 7.7 Fréquence d'isolement des BMR selon le mois

Mars a été le mois où plus de BMR ont été enregistré en 2016 (n=14) et Octobre pour 2017 (n=13).





**Figure 11:** fréquence d’isolement des BMR selon le mois de 2016 et 2017 au LRM de Bamako

## 7.8 Souches de BMR

**Tableau VI:** répartition des souches de bacilles multi-résistants isolée.

<b>Germes isolés</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
<i>Escherichia coli</i>	<b>84</b>	<b>55,26</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	20,39
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	7,24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	3,95
<i>Proteus mirabilis</i>	6	3,95
<i>Morganella morganii</i>	5	3,29
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	2,63
<i>Serratia spp</i>	2	1,32
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0,66
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,66
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,66

<b>Total</b>	<b>152</b>	<b>100,00</b>
--------------	------------	---------------

Les bactéries *E. coli*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii* étaient les plus représentés avec respectivement 55,26%, 20,39% et 7.24%.

Tableau VII : répartition par groupe bactérien des souches de bacilles multi-résistants

<b>Germes isolés</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>Entérobactérie (n=135)</b>		
<i>Escherichia coli</i>	84	62,22
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	22,96
<i>Proteus mirabilis</i>	6	4,44
<i>Morganella morganii</i>	5	3,70
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	2,96
<i>Serratia spp</i>	2	1,48
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0,74
<i>Providencia stuartii</i>	1	0,74
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0,74
<b>Total</b>	<b>135</b>	<b>100,00</b>
<b>Non fermentaire (n=17)</b>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	64,71
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	35,29
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100,00</b>

La majorité des espèces BMR isolées étaient des Entérobactéries (n=135/152)

### **7.9 Répartition des bactéries selon le type de résistance aux $\beta$ -lactamines**

Parmi les BMR isolées le E-BLSE ont représenté 73,33 %, vingt et trois virgule soixante once pourcent (23,71%) avaient un céphalosporinase de haut niveau avec une présence incertaine de BLSE. La résistance à l'imipénème était de l'ordre de (2,96%).

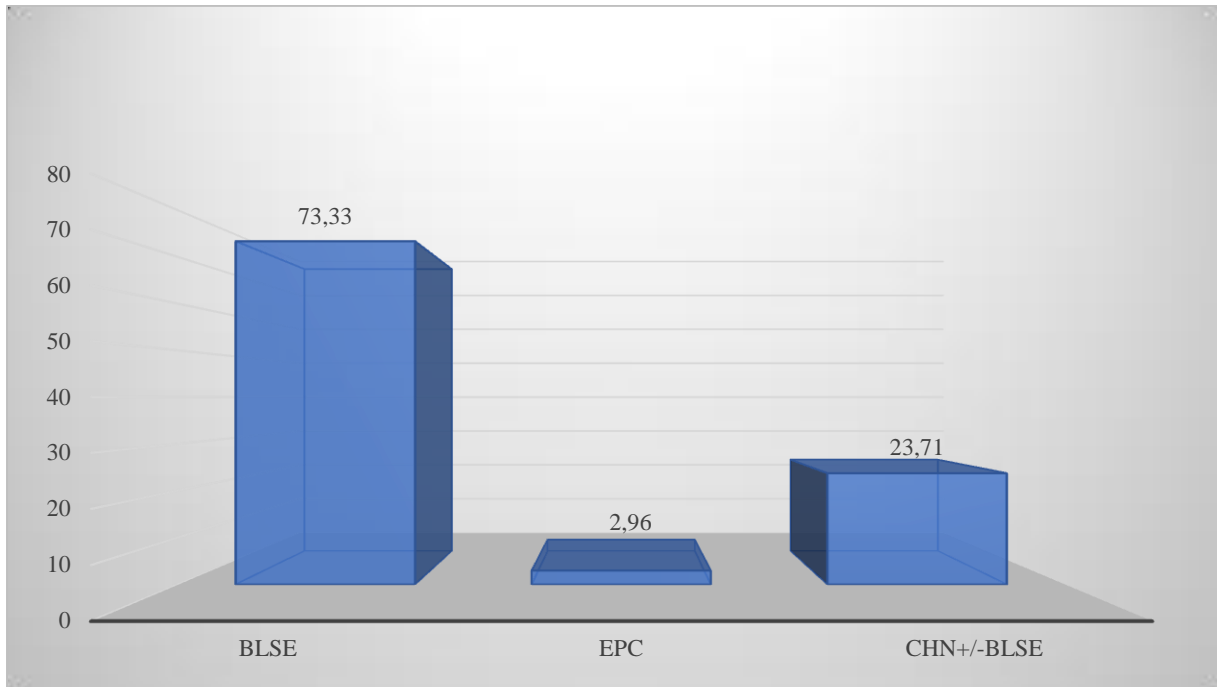


Figure 12 : répartition des bactéries selon le type de résistance aux  $\beta$ -lactamines

### 7.10 Résistance aux aminosides

La résistance à la tobramycine était de (86,96%), pour la gentamicine c'était à (74,74%) et pour l'amikacine (31,78%).

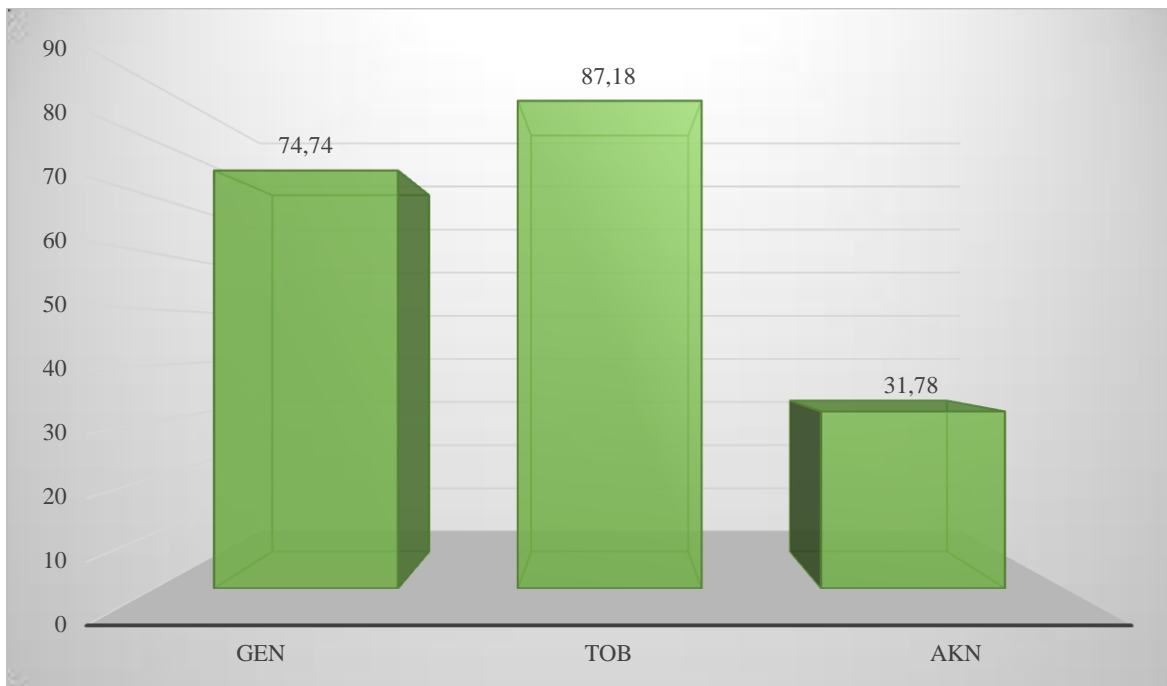
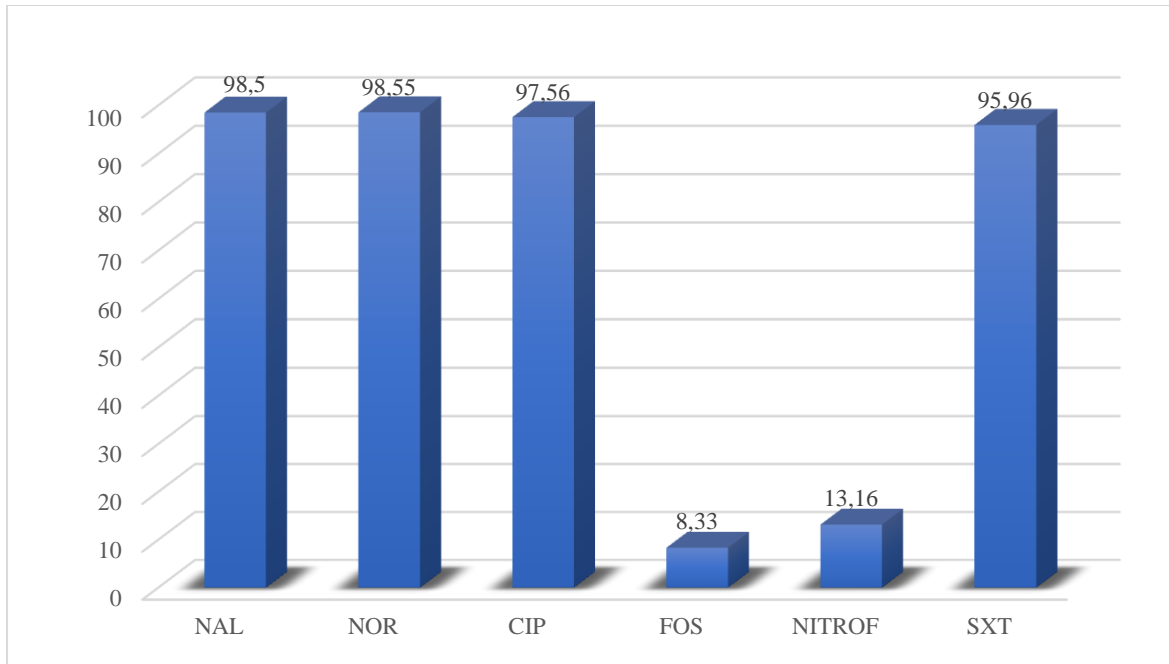


Figure 13: profil de résistance des Entérobactéries aux Aminosides

### 7.11 Résistance aux quinolones et aux autres types d'antibiotique

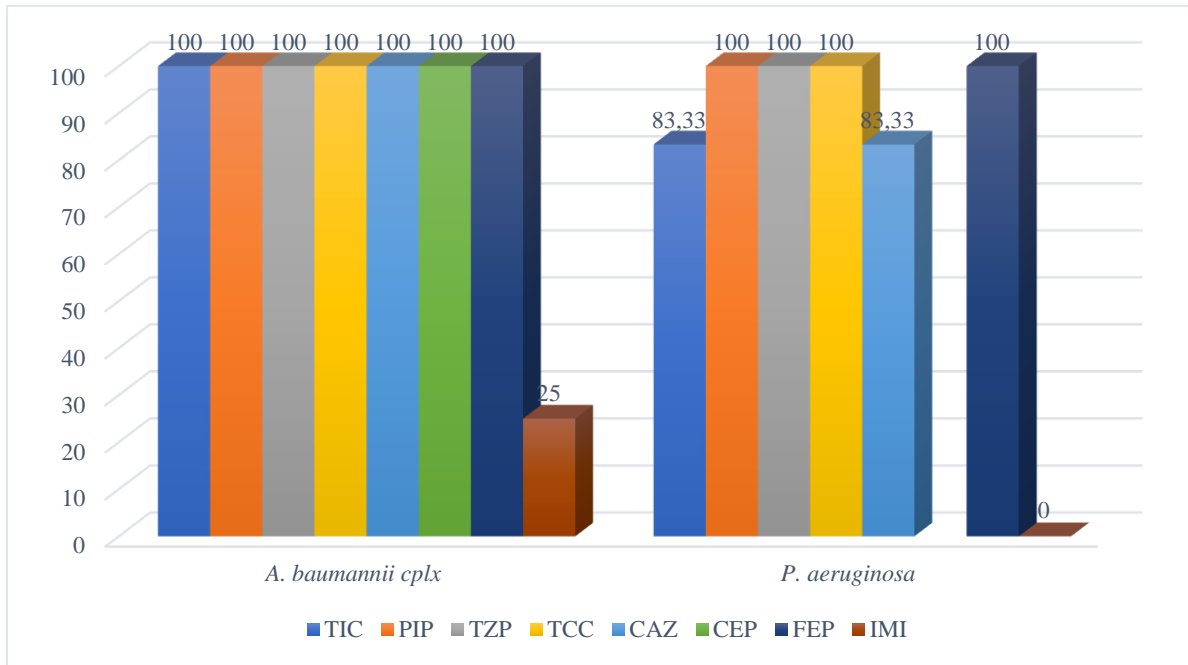
Une grande résistance des entérobactéries aux quinolones a été observé avec 97,56% de cas pour la ciprofloxacine. La résistance à la triméthoprime-sulfaméthoxazole était également très représentatifs (95,96%).



**Figure 14:**profil de résistance des Entérobactéries aux quinolones et aux autres ATB

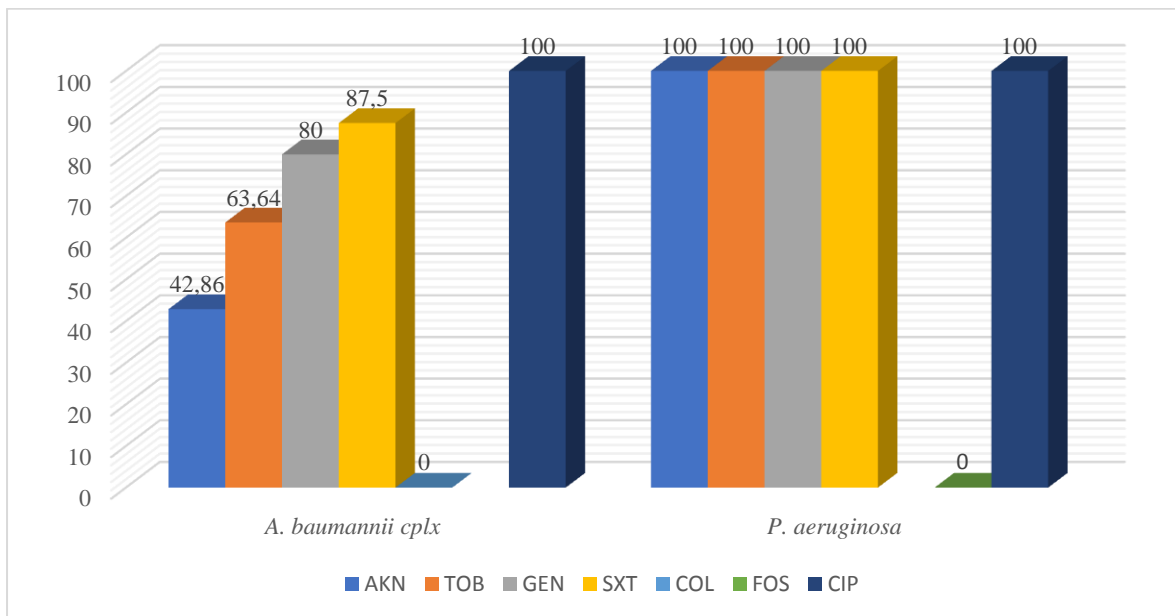
### 7.12 Profil de résistance aux antibiotiques des BGNnf

L'imipénème était la molécule la plus active sur *A. baumannii* avec une résistance de 25%, il l'était pour *P. aeruginosa* également avec 0% de résistance



**Figure 15** : profil de résistance des BGNnf aux  $\beta$ -lactamines

La colistine est restée active sur *A. baumannii* avec 0% de résistance. Dans le cas de *P. aeruginosa* c'est la fosfomycine qui est restée active à 0% de résistance, la colistine n'avait pas été testée.



**Figure 16** : profil de résistance aux aminosides et autres antibiotiques des BGNnf

## 7.13 Les associations de résistance

**Tableau VIII** : Les associations de résistance des entérobactéries

Associations de résistance	n (%)
$\beta$ +Q+A+SXT+NITRO+FOS	2 (1,48)
$\beta$ +Q+A+SXT+FOS	4 (2,96)
$\beta$ +Q+SXT+NITRO	2 (1,48)
$\beta$ +Q+A+NITRO	1 (0,74)
$\beta$ +Q+SXT+FOS	7 (5,18)
$\beta$ +Q+A+SXT	29 (21,5)
$\beta$ +Q+SXT	49 (36,3)
$\beta$ +Q+A	16 (11,85)
$\beta$ +A+SXT	2 (1,48)
$\beta$ +A	2 (1,48)
$\beta$ +Q	21 (15,55)

$\beta$  = Bêta-lactamines ; Q= Quinolones ; A= Aminosides ; SXT= triméthoprime-sulfaméthoxazole ; NITRO= Nitrofuranes ; FOS= Fosfomycine.

La combinaison bêta-lactamine +quinolones était la plus fréquente avec une prédominance de bêta-lactamines+ quinolones+ triméthoprime-sulfaméthoxazole (36,3%).

**Tableau IX** : associations de résistance des BGNnf

Association de résistance acquise	n (%)
$\beta$ +Q+A+COL	1 (5,88)
$\beta$ +Q+A	5 (29,41)
$\beta$ +Q	6 (35,30)
$\beta$ +A	5 (29,41)

$\beta$  = Bêta-lactamines ; Q= Quinolones ; A= Aminosides ; COL=Colistine.

La Co-résistance bêta-lactamines+ quinolones a également prédominé chez le BGNnf (35,30%)

## 7.14 Phénotypes de résistance

**Tableau X**: résistance acquise des bactéries représentatifs

**Contribution du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako dans la surveillance de la résistance aux antimicrobiens :  
cas des bacilles à Gram négatif fermentaires et non fermentaires multi-résistants**

---

<b><i>E. coli</i></b>	<b>n=84</b>
Résistance naturelle	AMC, C1G
Résistance acquise	
Bêta- lactamines	83AMX <sup>R</sup> - 83TIC <sup>R</sup> - 31TZP <sup>R</sup> - 65CFT <sup>R</sup> - 23CEF <sup>R</sup> - 71CTX <sup>R</sup> - 31CAZ <sup>R</sup> - 4IMI <sup>R</sup>
Aminosides	40GEN <sup>R</sup> - 61TOB <sup>R</sup> - 23AKN <sup>R</sup>
Quinolones	82NAL <sup>R</sup> - 45NOR <sup>R</sup> - 51CIP <sup>R</sup>
Autres ATB	3FOS <sup>R</sup> - 3NITRO <sup>R</sup> - 58SXT <sup>R</sup>
<b><i>K. pneumoniae</i></b>	<b>n=31</b>
Résistance naturelle	AMX TIC/PIC
Résistance acquise	
Bêta- lactamines	31AMC <sup>R</sup> - 8TZP <sup>R</sup> - 22CFT <sup>R</sup> - 3CEF <sup>R</sup> - 30CTX <sup>R</sup> - 31CAZ <sup>R</sup>
Aminosides	17GEN <sup>R</sup> - 23TOB <sup>R</sup> - 5AKN <sup>R</sup>
Quinolones	30NAL <sup>R</sup> - 19NOR <sup>R</sup> - 14CIP <sup>R</sup>
Autres ATB	2FOS <sup>R</sup> - 2NITRO <sup>R</sup> - 21SXT <sup>R</sup>

**Contribution du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako dans la surveillance de la résistance aux antimicrobiens :  
cas des bacilles à Gram négatif fermentaires et non fermentaires multi-résistants**

---

<b><i>A. baumannii</i></b>	<b>n=11</b>
Résistance naturelle	AMX, AMC, C1G, C2G, CTX, CRO, ETP, AZT, CHL, TMP, FOS
Résistance acquise	
Bêta- lactamines	11TIC <sup>R</sup> - 4PIP <sup>R</sup> - 7TCC <sup>R</sup> - 5TZP <sup>R</sup> - 11CAZ <sup>R</sup> - 2CEP <sup>R</sup> - 4FEP <sup>R</sup> - 2IMI <sup>R</sup>
Aminosides	9GEN <sup>R</sup> - 8TOB <sup>R</sup> - 3AKN <sup>R</sup>
Quinolones	1NAL <sup>R</sup> - 1NOR <sup>R</sup> - 9CIP <sup>R</sup>
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b>n=6</b>
Résistance naturelle	AMX, AMC, C1G, C2G, CTX, CRO, ETP, CHL, TMP, SXT
Résistance acquise	
Bêta- lactamines	5TIC <sup>R</sup> - 1PIP <sup>R</sup> - 5TCC <sup>R</sup> - 4TZP <sup>R</sup> - 1AZT <sup>R</sup> - 5CAZ <sup>R</sup> - 5FEP <sup>R</sup> - 6IMI <sup>R</sup>
Aminosides	4GEN <sup>R</sup> - 6TOB <sup>R</sup> - 4AKN <sup>R</sup>
Quinolones	3CIP <sup>R</sup>



## 8 Discussion

L'objectif principal de cette étude était de décrire la fréquence d'isolement des BMR au LRM de Bamako.

Notre étude a été limitée par le fait que tous les antibiotiques n'étaient pas toujours testés et les données et provenance des patients n'étaient pas toujours disponibles.

### Aspects sociodémographiques

Les bacilles multi-résistants Gram négatif ont représenté 22% des bacilles à Gram négatif isolés au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017. Ce résultat est inférieur à celui obtenu par **DEBABZA Manel** en Algérie, qui avait enregistré en 2015 une prévalence de 58,82% de BGNMR en milieu hospitalier. Notre étude ayant porté sur des prélèvements à la fois communautaires qu'hospitaliers nous pouvons dire que notre résultat des bacilles à Gram négatif isolés en milieu hospitalier reste inférieur à ce résultat de **DEBABZA Manel** (58,82% contre 25% dans notre cas) (31). Il est supérieur aux résultats de **Fatima Zahra AMHAL** qui avait enregistré en 2017, 16% de BMR à l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech ( ce résultat incluant les SARM) (32).

Les prélèvements d'origine communautaire ont été les plus représentés avec une prévalence de 34%. Ceci confirme les données de la littérature sur l'émergence communautaire des bactéries multi-résistants (33).

La répartition en fonction du sexe a montré que les BMR sont plus fréquentes chez les sujets masculins avec un taux de (54%) contre (46%) pour le sexe féminin. Ce qui corrobore avec l'étude de **Fatima Zahra AMHAL** qui a eu un taux de 66% pour le sexe masculin.

La répartition par tranches d'âge montre une croissance de la prévalence avec l'âge. La tranche de [61-80ans] étant la plus représentée, Cela corrobore avec les données d'une publication portant sur les facteurs multinationaux de risques d'infection à E-BLSE qui avait mentionné l'âge de 65ans et le sexe masculin parmi les principaux facteurs. A ceux-ci s'additionnait la longue durée de séjour en milieu de soins et une hospitalisation récente (34).

### Fréquence des BMR

Dans notre étude, les entérobactéries multi-résistants étaient de l'ordre de (89%) ce résultat est supérieur à celui de **DEBABZA Manel** qui avait enregistré (65,35%) d'entérobactérie multi-résistante. Par ailleurs les BGNnf multi-résistants étaient à 11% ceci inférieur à 36,67%.

Les espèces bactériennes multi-résistants isolés étaient : *Escherichia coli* (55,26%), *Klebsiella pneumoniae* (20,39%), *Acinetobacter baumannii* (7,24%), *Pseudomonas aeruginosa* (3,87%), *Proteus mirabilis* (3,87%), *Morganella morganii* (3,95%),

*Enterobacter cloacae* (2,63%), *Serratia spp* (1,32%), *Providencia stuartii* (0,66%), *Raoultella ornithinolytica* (0,66%), *Citrobacter koseri* (0,66%).

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* étaient les espèces bactériennes majoritairement multi-résistantes avec 82,89%. Ce résultat est supérieur à celui d'une étude faite à l'hôpital Hassan II du Maroc qui avait montré de façon majoritaire les mêmes espèces bactériennes multi-résistantes avec un taux de 74,89%.

Les BMR ont été majoritairement retrouvés dans les hémocultures (41,93%). Ce qui est comparable aux résultats de **Sandrine MOUDJONGUE OMOCK** qui avait trouvé 40% de BMR dans les hémocultures positifs en 2014 au LRM (35). Dans les urines 35,81% étaient des BMR ceci est comparable aux résultats obtenus par **Tony Jonan Zardelon ZITTI** qui avait trouvé 30,1% de BMR dans les urines en 2014 au LRM (36).

### Types de multi-résistance

Parmi les souches de bacilles multi-résistantes isolées pendant cette période d'étude les Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi ont représenté 73,33%, ceci est supérieur aux résultats obtenus lors d'une étude faite aux **CHU point G** et **Gabriel Touré** en 2014 par **Samba Adama Sangaré** qui avait trouvé 62,3% de E-BLSE (37).

Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont représenté 2,96% ce résultat est comparable à celui de **Fatima Zahra AMHAL** qui avait 1,67%. En effet les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ont été rapportées avec une fréquence croissante dans le monde depuis leur première description il y a plus de 20 ans (38). En 2017 la prévalence des organismes Gram négatifs résistants aux carbapénèmes en Afrique d'une publication était à 8,5% pour les entérobactérie (39). Les céphalosporinases de haut niveau ont représenté 23,71% ce résultat est inférieur aux résultats de **Mehdi Saadaoui** à l'hôpital Hassan II du Maroc qui avait trouvé 60% de ERC3G.

Les entérobactéries ont montré une grande résistance aux aminosides. La résistance la plus élevée a été observé vis-à-vis de la tobramycine (86,96%), la résistance à la gentamicine était de (74,74%) et à l'amikacine (31,78%).

Quatre-vingt-dix-sept virgule cinquante-six pour cent (97,56%) des entérobactéries étaient résistants à la ciprofloxacine ; ceci pourrait s'expliquer par l'utilisation abusive et irrationnelle de cette molécule dans notre pays.

Les fosfomycines et les nitrofurantoïnes ont été les antibiotiques les plus actifs sur les entérobactéries multi-résistantes isolés avec respectivement un taux de résistance de (8,33%) et (13, 16%).

Cent pour cent (100%) des *Acinetobacter baumannii* isolés au cours de cette études étaient hyper-productrices d'un céphalosporinase, pour *Pseudomonas aeruginosa* c'était à 83,33%. Cette résistance aux C3G étant éminente dans plusieurs études renvoie à une

utilisation abusive des carbapénèmes dans les services hospitaliers d'où l'émergence de la résistance aux carbapénèmes. Dans notre étude *Acinetobacter baumannii* étaient résistantes à 25% (2 cas sur 8) à l'imipénème ; ce résultat est inférieur à celui de **Mehdi Saadaoui** qui avait trouvé en 2008 au Maroc 49% (3 cas sur 7) de résistance à l'imipénème (40).

La résistance à l'amikacine était de l'ordre de (42.86%) pour *Acinetobacter baumannii* et (100%) pour *Pseudomonas aeruginosa*.

*Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* étaient à (100%) résistants à la ciprofloxacine.

La colistine était la seule molécule active (0% de résistance) sur *A. baumannii*. Dans le cas de *P. aeruginosa* il n'a été observé aucune résistance à l'imipénème et à la fosfomycine.

L'association de résistance la plus fréquemment rencontrée lors de notre étude était la résistance  $\beta$ -lactamines+ quinolones. Chez les entérobactéries c'est la résistance aux  $\beta$ -lactamines + fluoroquinolones et triméthoprimé–sulfaméthoxazole qui était prédominante avec une prévalence de 36,30% ; elle est suivie par l'association  $\beta$ -lactamines+ quinolones+ aminosides+ triméthoprimé–sulfaméthoxazole (21,50%). Ces résultats sont comparables à ceux de **Fatima Zahra AMHAL** qui avait rapporter les mêmes types de Co-résistance. Les rapports d'une autre étude avait conclu que les entérobactéries résistantes aux fluoroquinolones étaient fréquemment résistantes aux C3G, au aminosides et à la triméthoprimé–sulfaméthoxazole (41).

## 9 Conclusion et recommandations

### 9.1 Conclusion

Par son système de surveillance des résistances aux antibiotiques le Laboratoire Rodolphe Mérieux contribue à la surveillance de la résistance aux antibiotiques. Une prévalence de 22% de BMR a été observée pendant deux ans au LRM de Bamako. Les bacilles à Gram Négatifs les plus trouvées multi-résistantes étaient *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii*. La majorité des résistances aux C3G a été associée à une résistance aux quinolones, aux aminosides et à la triméthoprime-sulfaméthoxazole. Etant donné qu'un nombre élevé de ces bactéries a été retrouvé en communauté (surtout pour les entérobactéries), ceci renvoie à une prise de conscience sur l'ampleur de la résistance aux antimicrobiens dans notre pays et une prise en charge de ce fléau.

### 9.2 Recommandations

Nous formulons les recommandations suivantes :

#### Aux autorités sanitaires :

- Mettre en place un réseau de surveillance nationale de la résistance des bactéries aux antibiotiques ;
- Etablir une nouvelle politique de prescription et de dispensation des antibiotiques ;
- Sensibiliser la population sur l'émergence de la résistance aux antibiotiques et sur le danger de l'automédication.

#### Au LRM

- Continuer cette étude sur le période plus longue tout en déterminant les gènes de résistance ;
- Collaborer avec les autres laboratoires sur les données de la résistance.

#### Aux Médecins et Pharmaciens

- Se référer au « Guide national de l'antibiothérapie » pour toute antibiothérapie sans antibiogramme ;
- Ne délivrer les antibiotiques que sur prescription médicale.

#### Aux patients

- Respecter les posologies ;
- Eviter l'automédication.

## FICHE SIGNALÉTIQUE

**Nom :** Dembélé

**Prénom :** Nèma

**Adresse :** nemadem1@gmail.com

**Nationalité :** Malienne

**Titre :** Contribution du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako dans la surveillance de la résistance aux antimicrobiens : cas des bacilles à Gram négatif fermentaires et non fermentaires multi-résistantes

**Année universitaire :** 2017-2018

**Ville de soutenance :** Bamako - Mali

**Lieu de dépôt :** Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Bamako

**Secteurs d'intérêt :** Bactériologie, Santé publique.

### Résumé

L'objectif de l'étude était de décrire la fréquence d'isolement des Bacilles multi-résistantes à Gram Négatif au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako au Mali de 2016-2017. Au total 534 souches de bactéries à Gram négatif ont été isolées et 166 soit 22% étaient des bacilles multi-résistantes. Les souches communautaires étaient à 34% et les souches hospitalières à 25%. Le sexe masculin était plus représenté avec 53% et le sexe féminin étaient à 47%. La tranche d'âge majoritaire était de [61-80] ans.

Les entérobactéries ont représenté 89% des BMR isolées et les BGNnf étaient à 11%. Les espèces bactériennes : *E. coli*, *K. pneumoniae* et *A. baumannii* cplx étaient les plus représentées avec respectivement une prévalence de 55,26%, 20,39% et 7,24%. Les BMR ont été principalement isolées dans les hémocultures avec un taux de 41,93%. Dans les urines ils ont représenté 35,81%, les pus et liquide d'ascite avaient respectivement 28,85 et 26,67%. Parmi les BMR isolées les E-BLSE ont représenté 73,33 %, vingt et trois virgule soixante once pourcent (23,71%) avaient un céphalosporinase de haut niveau avec une présence incertaine de BLSE. La résistance à l'imipénème était de l'ordre de 2,96%. La résistance vis-à-vis des aminosides était : 74,74% pour la gentamicine, 87 ;8% pour la tobramycine et 31,78% pour l'amikacine. Une grande résistance des entérobactéries aux quinolones a été observé avec 97,56% de cas pour la ciprofloxacine. La résistance à la triméthoprim-sulfaméthoxazole était également très représentatifs (95,96%).

L'imipénème était résistant à 25% sur *A. baumannii* cplx. Pour *P. aeruginosa* L'imipénème était à 0% de résistance. La colistine est restée la seule molécule active sur *A. baumannii* cplx avec 0% de résistance. Dans le cas de *P. aeruginosa* c'est la fosfomycine qui est restée active à 0% de résistance.

Une Co-résistance aux  $\beta$ -lactamines + fluoroquinolones et triméthoprimé-sulfaméthoxazole a été constatée dans 36,30% des cas chez les entérobactéries. Dans le cas des BGNnf c'est la co-résistance bêta-lactamines+ quinolones qui était prédominante avec 35,30% de cas.

La résistance aux antibiotiques a atteint un niveau dangereusement élevé. Ce qui renvoie à une prise de conscience sur l'ampleur de la résistance aux antimicrobiens dans notre pays et une prise en charge de ce fléau.

**Mots clés :** Bactérie multi-résistante, antibiotique, résistance, émergence, bacilles gram négatif.



## MATERIAL SAFETY DATA SHEET

**Name:** Dembélé

**First name:** Nèma

**Address:** nemadem1@gmail.com

**Nationality:** Malian

**Title:** Contribution of the Rodolphe Mérieux Laboratory of Bamako in the surveillance of antimicrobial resistance: the case of multidrug-resistant fermentative and non-fermentative Gram-negative bacilli

**Academic year:** 2017-2018

**City of defense:** Bamako - Mali

**Place of deposit:** Library of the Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontostomatology of Bamako

**Sectors of interest:** Bacteriology, Public health.

The aim of the study was to describe the frequency of isolation of Gram Negative multidrug bacilli at the Rodolphe Merieux laboratory in Bamako, Mali from 2016-2017. A total of 534 strains of Gram-negative bacteria were isolated and 166 or 22% were multi-resistant bacilli. Community strains were 34% and hospital strains 25%. Males were more represented at 53% and females at 47%. The majority age group was [61-80] years old.

Enterobacteria accounted for 89% of isolated BMR's and BGNnf were 11%. The bacterial species: *E. coli*, *K. pneumoniae* and *A. baumannii* cplx were the most represented with a prevalence of 55.26%, 20.39% and 7.24% respectively. BMR's were mainly isolated in blood cultures with a rate of 41.93%. In urine they accounted for 35.81%, pus and ascites fluid had respectively 28.85 and 26.67%. Among the isolated BMR's the E-ESBL accounted for 73.33%, twenty-three point sixty ounces percent (23.71%) had a high-level cephalosporinase with an uncertain ESBL presence. Resistance to imipenem was of the order of 2.96%. Resistance to aminoglycosides was 74.74% for gentamicin, 87.8% for tobramycin and 31.78% for amikacin. High resistance of enterobacteria to quinolones was observed with 97.56% of cases for ciprofloxacin. The resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was also very representative (95.96%).

- Imipenem was 25% resistant to *A. baumannii* cplx. For *P. aeruginosa* Imipenem was at 0% resistance. Colistin remained the only molecule active on *A. baumannii* cplx with 0% resistance. In the case of *P. aeruginosa* it is fosfomycin that remained active at 0% resistance.
- Co-resistance to  $\beta$ -lactam + fluoroquinolones and trimethoprim-sulfamethoxazole was found in 36.30% of enterobacteria. In the case of BGNnf it is the co-resistance beta-lactam + quinolones that was predominant with 35.30% of cases.

Antibiotic resistance has reached a dangerously high level. This raises awareness of the extent of antimicrobial resistance in our country and the management of this scourge.

Key words: Multidrug-resistant bacteria, antibiotics, resistance, emergence, gram-negative bacilli.



## Références bibliographiques

1. Bryskier A. Antibiotiques et Agents Antibactériens. Dans: Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques. Paris: Ellipses; 1999. p. 54.
2. Tréfouël J. La recherche en chimiothérapie : chimiothérapie antibactérienne : récents développements. nov 1955;
3. La surveillance internationale de la résistance aux antibiotiques en Europe : l'heure est à la surveillance de l'utilisation des antibiotiques. Euro Surveill [Internet]. janv 2001 [cité 25 sept 2017];6. Disponible à: <http://fulltext.bdsp.ehesp.fr/Invs/EuroSurveillance/Vol6/1/v6n1.pdf>
4. C-E L, H L, A B, N F. Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. J Anti-Infect. 2017;13- 9.
5. OMS. Résistance aux antibiotiques. 2016.
6. Woerther P, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in human fecal carriage of extended spectrum beta-lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin Micro Rev. 2013;744- 58.
7. HAL A-S. Prévalence, circulation et caractérisation des bactéries multirésistantes au Burkina Faso. 24 févr 2017;
8. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. Front Vet Sci. 2017 [cité 2 oct 2017];4. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5554362/>
9. BMR RAISIN. Données minimum communes pour l'obtention d'indicateurs nationaux Guide méthodologique pour l'année 2015. 2015;
10. Marty N, Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU -TOULOUSE. Pouvoir épidémiogène des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR).
11. Nordmann P, Poirel L. Résistances aux antibiotiques émergentes et importantes chez les bactéries Gram négatif : épidémiologie, aspects théoriques et détection. Rev Médicale Suisse. 23 avr 2014;9022- 907.
12. OMS | L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques [Internet]. WHO. [cité 2 janv 2018]. Disponible à: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/>

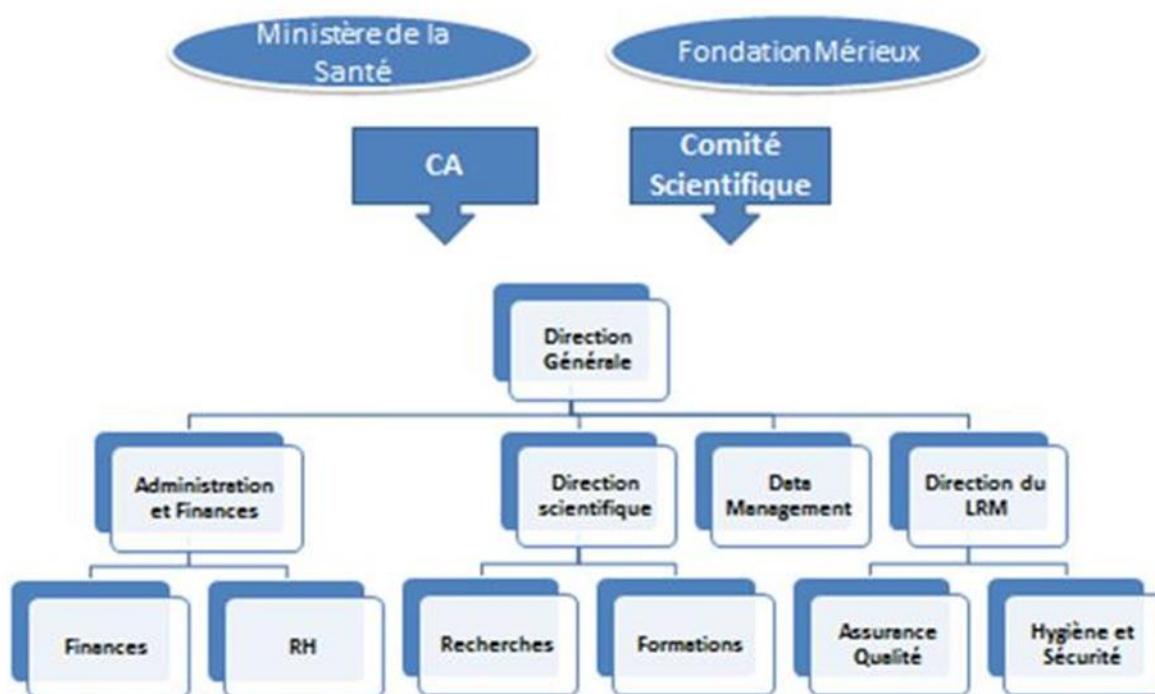
13. Tadesse BT, Ashley EA, Ongarello S, Havumaki J, Wijegoonewardena M, González IJ, et al. Antimicrobial resistance in Africa: a systematic review. *BMC Infect Dis.* 11 sept 2017;17:616.
14. Bryskier A. Epidémiologie de la résistance bactérienne. Dans: *Antibiotiques Agents Antibactériens et Antifongiques*. Paris: Ellipses; 1999. p. 91.
15. Fondation Mérieux, AFD. Résistance et antibiogramme RESAOLAB. 2010.
16. Patrick P. Biochimie de la résistance. Dans: *Antibiogramme*. 3<sup>e</sup> éd. Paris: ESKA; 2012. p. 17- 23.
17. RAISIN, CCLIN Nord, InVS. Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé en France. 2010.
18. WHO-PPL-Short\_Summary\_25Feb-ET\_NM\_WHO.pdf [Internet]. [cité 2 janv 2018]. Disponible à: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf)
19. Ouedraogo AS, Pierre HJ, Bañuls AL, Ouédraogo R, Godreuil S. Émergence et diffusion de la résistance aux antibiotiques en Afrique de l'Ouest : facteurs favorisants et évaluation de la menace. *Médecine Santé Trop.* 1 mai 2017;27(2):147- 54.
20. Plan d'action mondial pour combattre la résistance aux antimicrobiens [Internet]. [cité 4 janv 2018]. Disponible à: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/249548/1/9789242509762-fre.pdf>
21. Ferron A. Bactériologie médicale. 15<sup>e</sup> éd. C et R; 1994. 157-163 p.
22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8<sup>e</sup> éd. Canada: ELSEVIER; 2016. 263 p.
23. Pulcini C. Les bactéries multi-résistantes en 2015: du SARM aux BLSE et EPC, épidémiologie, causes et conséquences.
24. Brooks G., Butel J., Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's *Medical microbiology*. 21<sup>e</sup> éd. Appleton & Lange; 1998.
25. Hill EB, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. Dans: *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>ème</sup>. Patrick R. Murray; 2007.

26. Schreckenberger PC, Daneshevar MI, Hollis D. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella and Other Nonfermentative Gram-Negative RODS*. Dans: *Manual of clinical microbiology*. 9<sup>e</sup> éd. Canada: ELSEVIER; 2007. p. 770- 3.
27. Fauchère J louis, Avril J-L. *Bactériologie générale et médicale*. Paris: Ellipses; 2002. 365 p.
28. Bonnet R. *Beta-lactamines et Entérobactéries*. Dans: *Antibiogramme*. 3<sup>e</sup> éd. Paris: ESKA; 2012. p. 165- 88.
29. CAS-FM. 2018.
30. Wecher M. *L'antibiogramme en pratique courante*. Dans: *bactériologie médicale techniques usuelles*. ELSEVIER MASSON; 2007. p. 616- 9.
31. Manel D. *Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire*. 2015.
32. AMHAL FZ. *Profil épidémiologique actuel des bactéries multirésistantes Expérience de l'hôpital militaire Avicenne de Marrakech*. 2017.
33. afssaps. *Emergence des bactéries multi-résistantes - Importance renforcée du bon usage des antibiotiques*. 2010.
34. Ronen B-A, Jesu's R-B, Hande A, D J. *A Multinational Survey of Risk Factors for Infection with Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Nonhospitalized Patients*. *Clin Infect Dis*. juill 2009;682- 90.
35. MOUDJONGUE OMOCK S. *Mise en place d'un système de surveillance des résistances bactériennes aux antibiotiques: Cas des hémocultures au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako*. [Bamako]; 2014.
36. ZITTI TJZ. *Mise en place de la surveillance des résistances aux antibiotiques des germes responsables d'infections urinaires dans le Laboratoire Rodolphe Mérieux*. 2014.
37. Sangare SA, Rondinaud E, Maataoui N, Maiga AI, Guindo I. *Very high prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in bacteriemic patients hospitalized in teaching hospitals in Bamako, Mali*. *journal.pone0172652*. 2017;1- 11.
38. P. Nordmann *Entérobactérie et carbapénémases: bilan et enjeux d'un problème de santé publique*. Elsevier Masson SAS. Février 2014;44(2):51 - 6.

39. Lob S, Hackel M, Badal R. Global prevalence of Colistin and Carbapenem-resistant Gram-negative organism: SMART 2015-2016. IHMA Inc. 2017;(375):146- 7.
40. Saadaoui M. La fréquence des bactéries multi résistante à l'hôpital Hassan ii de Settat. 2008.
41. Abbott SL. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas and other Enterobacteriaceae. Dans: Manual of clinical microbiology. 9<sup>e</sup> éd. Canada: ELSEVIER; 2007. p. 709.

## 10 Annexes

### Annexe 1 : Organigramme du CICM



ORGANIGRAMME DU C.I.CM

Annexe 2 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

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

Document provisoire

Document opérationnel

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

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako

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

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

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

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

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

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

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

Mode opératoire de la technique de coloration de Gram Réf. M07 ANA BAC- 022 V2

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

Mode opératoire d'utilisation du microscope Réf. M04 MAT

D :

E :

**I – Buts**

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

**II - Domaines et personnels concernés**

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

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines

BK : Bacille de Koch

E. coli : Escherichia coli

Na Cl : Chlorure de potassium

ATB : Antibiogramme

**IV – Références**

**V – Contenu**

## MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

### 1. Principe

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

### 2. Matériel

- Bocal (aérobie et anaérobie) ;
- Automate (mini API<sup>®</sup> - VITEK<sup>®</sup> 2 Compact) ;
- Densitomètre ;
- Vortex ;
- Cassette VITEK<sup>®</sup> 2 Compact.

### 3. Consommables

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

### 4. Milieu de culture

- Gélose URI SELECT4

### 5. Etape pré analytique

#### 5.1. Nature du prélèvement

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

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

Réf. M07 ANA BAC- 029 V2

### 6. Analytique

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

### 6.1. Examen macroscopique

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

**Aspect :** limpide, légèrement trouble, trouble, hémorragique,

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

### 6.2. Mise en culture

Ensemencer systématiquement pour éviter toute contamination des urines :

- Homogénéiser le prélèvement par agitation ;
- Porter le numéro d'identification du patient sur la gélose Uri select 4 devant recevoir l'ensemencement ;
- Ensemencer sur une gélose Uri select 4 qui permet la numération et l'identification des principaux germes urinaires ;
- L'ensemencement proprement dit est réalisé à l'aide d'une oese stérile calibrée à 10 $\mu$ 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 (pour avoir 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 ...



## 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 10 $\mu$ l de l'échantillon;
- Remplir le quadrant de la cellule de KOVA.

### 6. Règles d'utilisation de la cellule de Kova

- Chaque cellule contient 10 grilles de comptage séparées ;
- Chaque grille est constituée de 9 cases, chacune étant constituée de 9 petits carrés ;
- Chaque cellule à un volume de 1  $\mu$ l = 1mm<sup>3</sup> ;
- 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  $\mu$ l ou mm<sup>3</sup> ;
- 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 4 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES**

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

**Document provisoire**

**Document opérationnel**

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

**Documents Qualité liés:**

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

**P:**

**Procédure de gestion des déchets**

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

**Mode opératoire d'utilisation du VITEK 2 COMPACT**

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

**D:**

**E:**

**I – Buts**

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

**II - Domaines et personnels concernés**

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

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen Cytobactériologique

ATB : Antibiogramme

**IV – Références**

**VContenu**

## 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<sup>®</sup> - Vitek<sup>®</sup> 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette Vitek<sup>®</sup> 2 Compact.

### 3. Consommables

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,
- Tubes à hémolyse,
- Oeses,
- Cartes Vitek<sup>®</sup> 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies.

### 4. Réactifs

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

### 5. Etape pré analytique

#### 5.1. Nature du prélèvement

La nature du prélèvement doit être inscrite en renseignement clinique sur la fiche d'analyse qui accompagne le prélèvement. Le prélèvement doit être collecté soit dans un tube sec, soit

par écouvillonnage et acheminé immédiatement au laboratoire, à défaut le conserver au frais pour le lendemain

## **5.2. Localisation**

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

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

Cutané	Oreille droite	Narine droite	Plaie	Cathéter
Lait maternel	oreille gauche	Narine gauche	Ulcère	Escarre
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 d'Api Medium (si prélèvement par écouvillonnage),
- Identifier un tube à hémolyse contenant un bouillon de cœur-cerveille 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

**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,
  - \* Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
  - \* Chapman, incubé en aérobiose,
  - \* Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
  - \* CAN 2, 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 cités ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

#### **6.1.4. Lecture et interprétation**

- Identifier et faire les antibiogrammes sur les colonies suspectes
- Si la culture est stérile après 24 heures d'incubation, ré incuber les géloses au sang sous 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, ▪ 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 Méricilline résistants et Vancomycine résistants...).

#### **6.1.5. Interprétation des antibiogrammes**

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

#### **6.2. Validation technique/ Critères de repasse**

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

#### **6.3. Hygiène et sécurité**

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel à 10 %
- Toujours 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 paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de javel et au savon anti-bactéricide.

## **7. Etape post analytique**

### **7.1. Validation biologique**

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

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

### **7.2. Rendu des résultats**

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

### **7.2. Rendu des résultats**

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

### **7.3. Gestion des déchets**

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

### **7.4. Archivage des données**

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

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

**Document provisoire**  
**nel**

Document opérationnel

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

**Documents Qualité liés:**

**MAQ: Manuel Qualité LRM**

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

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

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

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

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

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

**D:**

**E:**

**I. Buts**

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

**II. Domaines et personnels concernés**

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

**III. Abréviations/Définitions**

**IV. Références**

**V. Contenu**

## **MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES**

### **1. Principe**

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

### **2. Matériel**

- Microscope,
- Bec benzène,
- Micropipettes,
- Pipettes pasteur,
- Plaque chauffante,
- Etuve,
- Automates (mini API - Vitek<sup>®</sup> 2 Compact),
- Vortex,
- Densitomètre,
- Cassette Vitek<sup>®</sup> 2 Compact,
- BACT / ALERT 3D,
- Gants,
- Embouts stériles,
- Lames porte objets,
- Poubelle pour déchets usagés.

### **3. Consommable**

- Gants,
- Embouts,
- Lame et lamelle,
- Anse,
- Cartes Vitek<sup>®</sup> 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies,
- Flacons aérobie et anaérobie, flacon pédiatrique pour le BACT / ALERT 3D.

### **4. Réactif**

- Milieux de culture : gélose chocolat, Cos, Chapman, Can2, CNA etc.
- Colorants de Gram,
- Solutions de révélation

### **5. Pré analytique**

#### **5.1. Condition du prélèvement**

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



## 5.2. Matériels

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

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

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

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

- Il pose le garrot, s'assure de l'asepsie en nettoyant le pli du bras à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, et enfin un coton imbibé de Bétadine.

- En fonction de l'âge, prélever 1 ml chez le nouveau-né, 2 ml enfant de 1-4 mois, 3 ml enfant de plus de 4 mois.

NB : Les flacons d'hémoculture doivent être bien mélangés et immédiatement acheminés au laboratoire après prélèvement. On retrouve au fond de chaque flacon des détecteurs de CO<sub>2</sub>, dont le signal sera synonyme de présence de germes pathogènes dans la culture.

## 6. Analytique

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

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

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

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

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

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

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

#### Pour sortir le flacon positif du BacT/ALERT 3D

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

### **Pour sortir le flacon négatif du BacT/ALERT 3D**

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

### **6.3. Traitement des flacons**

**Les flacons sortis négatif** ne feront pas l'objet d'étude et le résultat sera saisi « stérile » tout en mentionnant la date de sortie.

#### **Les flacons sortis positif**

- Désinfecter la partie caoutchouc du flacon avec de l'alcool iodé
- Mélanger voir vortexer le flacon
- Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille associée à une seringue de 10 ml
- Si le bouchon du flacon (en particulier pour le flacon anaérobie) est bombé, évoquant la présence de gaz dans le flacon, retirer le piston, laisser le gaz s'échapper via l'aiguille, puis passer à l'ensemencement.

#### **Examen direct et mise en culture**

- Sur une lame porter le numéro d'identification du patient, recouvrir d'une lamelle une à deux gouttes du bouillon bien mélangé et observer au microscope des éventuels germes mobiles.
- Après observation retirer la lamelle, laisser sécher sur la paillasse et procéder à la coloration de GRAM et lire aussitôt.

**NB :** La coloration de GRAM permet au Biologiste ou à ses assistants d'informer le site clinique Pneumobama à la pédiatrie du résultat obtenu.

Selon la morphologie lue, ensemercer :

- Si **bacille à GRAM négatif**, ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Drigalski et sur une gélose au sang frais (COS) à incuber sous CO<sub>2</sub>,
- Si **cocci à GRAM positif type Staphylocoque** (en grappe de raisin), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu Chapman, sur une gélose au sang frais et au chocolat à incuber sous CO<sub>2</sub>,
- Si **cocci à GRAM positif type Streptocoque** (en chaînette), ensemercer une goutte du bouillon sur milieu gélose au sang frais (COS) incubée sous CO<sub>2</sub> ;
- Si présence **de levures** ensemercer un sabouraud ou un CAN2.

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

### **6.4. Lecture et interprétation**

- Bacille à GRAM négatif type entérobactérie oxydase négative, identification galerie API 20 E ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme,
- Bacille à GRAM négatif type non entérobactérie oxydase positive, identification galerie API 20 NE ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme
- Cocci à GRAM positif type Streptocoque, identification galerie API 32 Streptocoques ou carte Vitek GP tout en ensemençant une gélose au sang cuit à partir de la suspension bactérienne en posant un disque d'optochine
- Cocci à GRAM positif type Staphylocoque :  
Si catalase positive, slidex négatif et mannitol négatif Staphylocoque à coagulase négative à discuter avec le Biologiste ou ses assistants,  
Si catalase positive, slidex positif et mannitol positif, identification galerie API Staphylocoques ou carte Vitek suivi de l'antibiogramme
- Autre morphologie, à discuter avec le biologiste ou ses assistants.

- Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur milieu de culture en fonction du germe.

### **6.5. Interprétation des antibiogrammes**

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

### **6.6. Validation technique / Critères de repasse**

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

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

### **6.7 Résultats**

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

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

### **6.8 Hygiène et sécurité**

- Avant et après les manipulations, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel
- Toujours manipuler en présence d'une flamme ou sous une hotte.
- 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 contaminants
- Eviter tout liquide inflammable aux environs de la flamme
- Eviter les bouteilles déposées au bord des paillasses
- Se laver les mains régulièrement à l'eau de robinet et au savon anti-bactéricide.

## **7. Post analytique**

### **7.1 validation biologique**

Réservé au biologiste ou ses assistants

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

Elle est objectivée par la signature du  
compte-rendu

## **7.2 Hygiène et sécurité**

Lors des manipulations il faut toujours :

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

## **7.3. Gestion des déchets**

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

## **7.4 Archivage**

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

**Annexe 6 : MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE D'ASCITE**

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

Document provisoire

**X** Document opérationnel

**Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité**

- Dossier commun sur le serveur

**Documents Qualité liés:**

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

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

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

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

**D:**

**E:**

**I – Buts**

Décrire la technique de la réalisation de l'ECBU du liquide d'ascite.

**II - Domaines et personnels concernés**

Secteur de Bactériologie. Les Biologistes et tous les responsables techniques habilités à utiliser cette technique.

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

ECB : Examen CytoBactériologique

**IV – Références**

Documents du laboratoire

**V – Contenu**

## MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DU LIQUIDE D'ASCITE

### 1. But

L'examen cyto bactériologique du liquide d'ascite est essentiellement considéré ici dans le cadre des infections des cirrhoses. Il peut y avoir également surinfection au cours d'une dissémination sanguine bactérienne. L'ascite peut également être le point de départ d'une bactériémie.

### 2. Principe

Le liquide d'ascite est une ponction faite aseptiquement au niveau de la fosse iliaque gauche, après toilette de la peau au savon liquide, dégraissage à l'éther, puis désinfection avec un antiseptique fort comme l'alcool iodé. Le liquide est recueilli à l'aide d'une seringue puis transféré :

- Dans un tube stérile (tube sec) en vue de l'étude bactériologique,
  - Dans un tube avec un anticoagulant (tube hépariné) en vue de l'examen cytochimique
- Le prélèvement doit parvenir au laboratoire accompagné de renseignements cliniques et du contact du médecin traitant.

La possibilité de tuberculose pulmonaire, et donc la recherche du Bacille de Koch, doit toujours être envisagé.

### 3. Matériel

- Micropipettes réglable ;
- Portoir en fer ;
- Conteneur de déchets contaminés ;
- Plaque chauffante.

### 4. Consommable

- Gants à usage unique ;
- Lames ;
- Embouts ;
- Tubes à hémolyse ;
- Cellule de kova.

### 5. Réactif

- Colorant de Gram ;
- Bouillon (cœur-cervelle) ;
- Milieux de culture (gélose au sang frais COS et au sang cuit Chocolat) ;
- Cartes Vitek<sup>®</sup> 2 Compact ou galerie classique Mini Api.

### 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 ;
- Portoir réactif ;
- 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 sont conservées et utilisées comme lames de référence

### **7. Protocole de 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 30secondes ;
- 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 négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violette.

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

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

Document provisoire

Document opérationnel

Exemplaires : - Classeur Assurance Qualité

- Dossier commun sur le serveur Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Assurance Qualité du LRM de Bamako P:

MO:

D:

E:

**I – Buts**

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

**II - Domaines et personnels concernés**

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

**III - Abréviations/Définitions**

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux

**IV – Références**

**V – Contenu**



**MODE OPERATOIRE DE LA  
TECHNIQUE DE COLORATION DE  
GRAM**

## **1. Principe**

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

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

## **2. Matériel**

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

## **3. Consommable**

- Gants ;
- Lames porte objet ;
- Tube conique ;
- Pipette pasteur.

## **4. Réactif**

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

## **5. Nature du prélèvement**

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

## **6. Contrôle de qualité**

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

## **7. Technique**

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

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laisser agir une minute (violet de gentiane) ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Recouvrir la préparation de lugol, laisser agir une minute ;
- Rejeter le colorant puis laver à l'eau ;
- Décolorer à l'alcool-acétone ;

- Rincer à l'eau de robinet et recouvrir la lame de solution de fuchsine diluée, laisser agir 30 secondes ;
- Rejeter la Fuchsine, laver à l'eau, égoutter, sécher entre deux feuilles de papier buvard propres ;
- Lire le frottis coloré au microscope à l'objectif x100 à l'huile d'immersion.

## **8. Résultat**

A la coloration de Gram :

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

## Annexe 8 : Formulaire

IDENTIFIANT	PROVENANCE	SEXE	MOIS/AN
001	HOSPITALIERE	FEMININ	24/08/2017
AGE	NATURE DU PRELEVEMENT	type de resistance	BACTERIE
100	URINE	BLSE	E.coli
BETA-LACTAMINES			
AMX	TZP	CTX	
R		S	
AMC	CFT	CAZ	
R		R	
TIC	CEF	IMI	
R	S	S	
AMINOSIDES			
AKN	GEN	TOB	
S	S		
QUINOLONONES			
NAL	CIP	NOR	PEF
R	R	R	
AUTRES			
TSU	NITROFURANES	FOSFOMYCINE	
R	S	S	

Formulaire pour les entérobactéries

**Contribution du Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako dans la surveillance de la résistance aux antimicrobiens : cas des bacilles à Gram négatif fermentaires et non fermentaires multi-résistants**

IDENTIFIANT	PROVENANCE	SEXE	MOIS/AN
001	COMMUNAUTAIRE	MASCULIN	18/11/2016
AGE	NATURE DU PRELEVEMENT	TYPE DE RESISTANCE	BACTERIE
054	PUS	CHN	<i>A.baumannii</i> c)
BETA-LACTAMINES			
TIC	TCC/AMC	PIC	
R	R		
TZP	CEP	AMX	CTX
CEF	IMI	ATM	
	S	R	
FEP	CFT	CAZ	
R		R	
AMINOSIDES			
GEN	TOB	AKN	
	R	R	
QUINOLONES			
NAL	PEF	CIP	
		R	
AUTRES			
TSU	FOS	COL	
R	S	S	

Formulaire pour les BGNnf

## **11 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 !**