MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES DE BAMAKO

FACULTE DE PHARMACIE

REPUBLIQUE DU MALI
Un Peuple- Un But- Une Foi

U.S.T.T.B

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2013- 2014.

THESE N°……/ 2014.

RESISTANCE BACTERIENNE EN CAS D'INFECTIONS DE PLAIES DIABETIQUES : DIAGNOSTIC ET SURVEILLANCE AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX DE BAMAKO

THESE

présentée et soutenue publiquement le 27/ 06/ 2014 devant la Faculté de Pharmacie pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

par

AHANOGBE Kokou Anani Lem

MEMBRES DU JURY

PRESIDENT : Pr Flabou BOUGOUDOGO

MEMBRES : Pr Abdel Kader TRAORE

Pr Bourèma KOURIBA

Dr Ibrahim NIENTAO

Dr Madiassa KONATE

DIRECTEUR DE THESE : Pr Souleymane DIALLO II

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013-2014.

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE – MAITRE DE CONFERENCES

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

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY – ADMINISTRATEUR CIVIL

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN - CONTROLEUR DES FINANCES

LES PROFESSEURS HONORAIRES

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

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. Professeur/Directeur de recherche

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

2. Maître de conférences

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

3. Maître assistant

Mme Fanta	SANGHO	Santé Communautaire
M. Aldjouma	GUINDO	Hématologie

4. Assistant/Attaché de recherche

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

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. Professeur/Directeur de recherche

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

2. Maître de conférences

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

3. Maître assistant

M. Sékou	BAH	Pharmacologie

4. Assistant/Attaché de recherche

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

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Drissa	DIALLO	Pharmacognosie

2. Maître de conférences

M. Saibou	MAIGA	Législation Chef de DER
Mme Rokia	SANOGO	Pharmacognosie
M. Alou Amadou	KEITA	Galénique

3. Maître assistant

M. Yaya	COULIBALY	Législation
M. Loséni	BENGALY	Pharmacie Hospitalière

4. Assistant/Attaché de recherche

M. Bacary Moussa	CISSE	Galénique
M. Bourama	TRAORE	Législation
M. Hamma Boubacar	MAIGA	Galénique
M. Hammadou Abba	TOURE	Bromatologie
M. Adama	DENOU	Pharmacognosie
M. Mahamane	HAIDARA	Pharmacognosie
M. Issa	COULIBALY	Gestion
M. Souleymane	DAMA	Sciences Pharmaceutiques
M. Antoine	DARA	Sciences Pharmaceutiques
M. Balla Fatogoma	COULIBALY	Pharmacie Hospitalière
M. Karim	TRAORE	Sciences pharmaceutiques

DER DES SCIENCES FONDAMENTALES

1. Professeur/Directeur de recherche

M. Mahamadou	TRAORE	Génétique
M. Mamadou	KONE	Physiologie
M. Sékou Fantamady	TRAORE	Biologie-Génétique-Zoologie

2. Maître de conférences

M. Mouctar	DIALLO	Biologie/Parasitologie
M. Kaourou	DOUCOURE	Physiologie
M. Lassana	DOUMBIA	Chimie minérale

M. Mamadou	CISSE	Biologie Végétale

3. Assistant/Attaché de recherche

M. Moussa	KONE	Chimie organique
M. Amidou	DOUCOURE	Chimie organique
M. Seydou Sassou	COULIBALY	Biochimie
M. Oumar	GUINDO	Biochimie
M. Mamadou Lamine	DIARRA	Botanique

CHARGES DE COURS & ENSEIGNANTS VACATAIRES

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

ENSEIGNANTS EN MISSION

Pr Babacar	FAYE	Pharmacodynamie
Pr Amadou	DIOP	Biochimie
Pr Pascal	BONNABRY	Pharmacie Hospitalière
Pr Gaoussou	KANOUTE	Chimie analytique (en disponibilité)

DEDICACES

Au Dieu tout puissant et très miséricordieux ;

A la Sainte Vierge Marie ;

A ma mère Célestine (in memoriam) ;

A mon père Emmanuel ;

A mon grand-frère Godfried (in memoriam);

A mes grands frères Samson et Carlos ;

A ma tante Victoire et son fils Thomas ;

A mon oncle Antoine ;

A Stella, Marcelle, Dodji, Roland, Abel, Edi, Eli, Tufa, Délali, Julien, Mylène, Janine, Emilie;

…je dédie cette thèse.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements…

- Seigneur Dieu, merci pour ton œuvre dans ma vie.

- Vierge Marie, très souvent j'ai eu besoin de toi et jamais tu ne m'as lâché. Continues d'intercéder pour moi.

- Ma mère Célestine : « …*Aimez-vous les uns les autres comme je vous ai aimés ! Ne me mens pas dis moi la vérité, je préfère qu'on me dise la vérité...* » Ces paroles de tes mélodieux chants sonneront à toujours dans nos têtes et l'effort sera toujours fait pour se rapprocher de tes préceptes. Que ton âme repose en paix !

- A mon père Emmanuel, pour sa présence. Le talent oratoire reçu et la facilité de choix de mots que notre éducation nous a offert aurait pu me faire écrire un livre de toi. Dieu te bénisse.

- A mon grand-frère Godfried, tu es l'architecte, tu es l'exemple, tu es le talent, tu es la discipline, tu es l'excellent. Tu es juste trop vite parti. Mais on a appris de toi. Sois béni !

- A mon patron de frère Carlos, tu demeures le fils que tout père rêverait certainement d'avoir et une mère encore plus. Sois béni. Dieu veille.

- A mon neurochirurgien de frère Dr Samson, tu es l'exemple qu'une bonne dose de bénédiction divine et une méthode en toute situation conduisent invariablement au succès.

- Tante Victoire, tu es une sœur, une tante, une mère, une amie ; sois à toujours bénie. Merci pour ta présence.

- Thomas, il n'y a pas de raison pour que tu n'excelles pas. Félicitations déjà et fais toi plaisir pour la suite.
- Oncle Antoine, tu es un patron, merci pour ta légendaire présence. Tu as participé à chaque minute de nos vies et tu es un excellent exemple de succès.

- A mes oncles, tantes, cousins, cousines, neveux et nièces merci de vos bons soutiens. Kafui, Essé, Emilie, Janine, Mylène, Akofa, Dela, Constance…
- A ATAYI-AGBOBA Stella. Merci pour ton soutien. Sois à toujours bénie.
- A KOUDJI Marcelle, frangine sûre et FANTODJI Komlan Dodji Ezeckiel, dur frangin. Merci pour ce soutien indéfectible et cette sincérité de vie.
- A GBODUI Roland-Joseph et ELITCHA Abel. Ce fut bien et ce sera toujours bien de vous avoir tous les deux.
- A mes amis du quartier : Koffi, Séto, Mouhazou, Taofic, Komi, Komlan, Espoir, Winnie, Rosine, Georgette, Tatiana, Muriel, Sybil, Emefa, Claudia, Essenam, Rachida, Délali ; restez forts.
- A mes amis du primaire et du secondaire : Stéphanie, Marcelle, Tagayi, Lonla, Deh, Anthony, Perlas c'était beau de vous avoir côtoyés.
- A mes amis du Collège Protestant de Lomé Tokoin (CPLT) : Kamassé, Essénam, Tokpé, Akolly, Senyo, Bruno, Elom, Kibanou, Saya ; merci d'avoir si bien animé ma vie. J'espère que les jeunes ont conservé la dynamique des clubs de radio et rally culture.
- A mes coéquipiers de l'équipe shallows de volley ball : Séfako, Georges et le coach(RIP) et le président de la fédération togolaise de volley ball M. AGBODJAN ; ce fut très éducatif.
- A mes coéquipiers de l'équipe de basket Etoile filante et partenaires de la ligue nationale, ce fut un bon plaisir et une expérience unique, le tennis est ma prochaine aspiration.
- Au club des flutistes du CPLT, c'était relaxant ces moments ensemble. Si loin de vous je me suis essayé à la guitare mais je crois que j'attends une invitation pour une nième partie de flute.
- A la chorale du CPLT, c'est avec vous que j'ai été président pour la première fois et à part m'avoir révélé mon type de voix, vous avez encré en moi l'idée que l'union fait non seulement la force mais aussi la beauté.
- A mes amis des clubs de jeux d'échecs, de tennis de table et autres jeux de société, ce fut agréable votre compagnie et votre bonne adversité.
- Aux décodeurs du football et parents attitrés, Emmanuel GUETABA, Ridwane BAWA-KAWTE, Tony ZITTI, Jean-claude EPOTE EWANE, Guillaume SOUNIN, Dr Fall DOGO, Dr Epiphane EKLO, Dr Eyram AMEKOUDI, Dr Nanakan N'GUISSAN ; la « *decima* » c'est le respect ! Halla Madrid !!! et toi Chelsea « *Right to play ?* ».
- Aux amis de sona, Julien, Razack, Hussard, Francis, Keletigui, Lassine merci pour ce sens que vous donnez à l'accueil.

- A Christelle, Nadia, Magui, Angèle, Marius, Flavi ; ces moments de retraite spirituelle ont gravé en moi la définition de la paix intérieure.
- A vous Larissa, Charlaine, Anita, Rose Mahélé, Clémence, Flore,Grace, Eliane, Drisile, Cynthia, Maelle, Nana, Suzanne, Sara, Elomvi, Chimène, Carole, Christelle, Ana, Béatrice, Gracia, Rose, Adjara, Maï, Lynda, Ornella, Dr Bella pour ce respect entretenu et ce bien vivre partagé.
- A vous Dr NYASENU Xavier Tufa, Dr DAGBA Edem, Dr MIHLUNDO Louis, Dr N'DA, Dr TITIKPINA Nassifatou, Dr APEDJINOU Christian, Dr DEGBE Stéphan, Dr N'GUISSAN Nanakan, Dr Ag Mohamed, Dr Arnaud, KOUMA Stéphanie, SEGBOR Eli, Délali, Kokou AGBEMADON, Touré, Gabriel, pour votre soutien.
- A mes voisins de la cité « *JAPON* » : Ridwane, Doryne, Armelle, Alexandrine, Nèma, Christian, Franc-Eric, Eliane, Clémence ; vous m'avez offert un cadre de confiance et votre simplicité à tous a facilité le périple.
- Tony ZITTI le scientifique. Que de chemin fait depuis…
- Fatoumata MAÏGA. Notre complicité franche a été fructueuse. Dieu te bénisse et t'accorde le meilleur.
- Frères de lutte de la commission scientifique : Josué TOGO, Marcel d'ALMEIDA, Marie SOGOBA, Hawa SANOGO, Emmanuel GUETABA, Sory Ibrahima FOMBA, Jean-Claude EWANE EPOTE, Dr Emmanuel SISSIKO ; on aura fait des combats utiles. Deux fois sur le podium de la FESPAO en deux ans dont une médaille d'or et deux de bronze, c'est notre moisson merveilleuse.
- Marcel, Stella, Cynthia, Dodji, Rose, Armanda, Amdia, Nana ; je ne regrette pas le temps utilisé à partager avec vous mes petites connaissances. J'ai confiance que de bonnes valeurs sont gardées. Prenez soin des plus jeunes !
- A Fidèle, Harishu, Honorine, Geneviève, Sabrina, Nassifa, Christian. Merci pour votre amour et votre simplicité.
- A l'Union des élèves, étudiants et stagiaires togolais (UESTM) au Mali et à son secrétaire général Firmin KESSIE et président de cellule FMPOS Nicolas TIGHANKPA. Ce fut une bonne chose d'avoir relevé l'UESTM. Ce fut un honneur d'avoir milité à vos côtés. Puisse le vrai message être cerné et que l'humilité toujours prévaloir. Anciens présidents de la cellule UESTM-FMPOS (…Dr Epiphane, Emmanuel, Têko)! Puisse ceux à venir vous imiter!

Un remerciement spécial…

- A la terre malienne, pour l'hospitalité.
- Au Pr Souleymane DIALLO II, vous êtes un grand. Je me suis senti particulier sous votre direction car vous avez assisté à mon évolution dans les techniques de laboratoire. Ce fut bien d'apprendre en sachant qu'on aura la réponse à notre inquiétude et qu'on l'aura d'un pédagogue confirmé. Vous nous avez fait comprendre l'importance du travail bien fait et aimer la dextérité dans la pratique. Merci pour cette école de la vie à laquelle vous nous avez acceptés.
- Au Pr Drissa DIALLO ; dans mon rôle de président de la commission scientifique de l'Amicale des Etudiants en Pharmacie (AEP), vous côtoyer, fut un cadeau car il n'était pas que question de science si de ce côté vous êtes un emblème et que nous avons été très satisfaits ; mais aussi de relation humaine. Nous nous souviendrons toujours de vos conseils.
- Au Pr Abdel Kader TRAORE, merci pour l'intérêt accordé. Nous sommes fiers d'avoir mérité votre attention.
- A notre doyen Pr TRAORE, vous nous avez marqué par vos observations et point de vue. Recevez par ce document l'expression de notre profond respect.
- Au Pr Ousmane DOUMBIA parrain de notre promotion, votre charisme légendaire nous a séduits et avoir été apprécié de vous a été un honneur.
- Au personnel de la Pharmacie Hospitalière et spécialement à ses directeurs, ancien Dr Seydou COULIBALY et actuel Dr Sékou Bah. Merci de nous avoir ouvert votre cadre. Nous avons beaucoup appris.
- Aux personnels et responsables des pharmacies CITE et BEL AIR, vous nous avez offert un environnement favorable à notre apprentissage. Merci pour votre bonne fraternité.
- Au responsable du service de Néphrologie de l'hôpital Point G pour avoir pris du temps à nous initier aux soins infirmiers.
- Au responsable du Centre National de Lutte contre le Diabète(CNLD), le cadre de nos enquêtes pour des compétions internationales souvent menées avec succès. Merci de nous avoir lancé sur le chemin de la recherche.
- Aux responsables et personnels du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) (Pr DIALLO, Dr YALCOUYE Daniel, Aïda, Nana, Lala, Awa, Kadi, Judicaël OUEDRAOGO, TOURE, MAIGA, …) ; Dieu vous bénisse de nous avoir acceptés dans vos laboratoires. Ce fut une expérience unique de notre vie d'interne en pharmacie. Elle

fut agréablement enrichie par la jovialité de l'ambiance, du franc parlé de nos maîtres et de la disponibilité du Directeur, qui a toujours trouvé solution à nos inquiétudes.

- Aux Dr Doumbia et internes du CICM, Fatoumata, Tony, Sandrine, Elisabeth, Doussou, Sonia, Cissé ; merci d'avoir partagé aussi bien mes journées de travail.
- A nos maîtres qui nous ont offert leur cadre de travail pour nos études et stages notamment le responsable du Département de Médecine Traditionnelle (DMT) et le directeur du Laboratoire National de la Santé (LNS) ; recevez ici le témoignage de notre respect et profonde considération.
- A mes enseignants du primaire et du secondaire ; tous mes respects.
- A mes maîtres à la FAPH ; toutes mes admirations.
- A l'Amicale des Etudiants en Pharmacie du Mali (AEP), son père fondateur Dr Mamadou B. COULIBALY et ses mentors Youssouf DIARRA, Fatoumata O. MAIGA, Nouhoun THIAM, Daniel DARA et le boss Kader ; ce fut beau d'avoir travaillé avec vous. Ce fut excitant nos ambitions. Ce fut respectables nos trouvailles. Ce fut honorable l'avis de nos maîtres. Ce fut de combats utiles. Bonne chance pour la suite !
- A la Fédération des Etudiants en Sciences Pharmaceutiques de l'Afrique de l'Ouest (FESPAO) pour ces séjours agréables de séminaires dans ces différents pays ; toujours en quête de connaissance. « *Toute culture nait du mélange, de la rencontre, des chocs. A l'inverse, c'est de l'isolement que meurent les civilisations* » Octavio Paz. Que les cadets maintiennent cette flamme de l'intégration allumée !
- Aux amis du complexe sportif, le pro André, Karim, Lucas, Momo, Dr Juste, Dr Hervé... Serginho aura aimé chaque dimanche matin passé avec vous. Adama ! Roger comprendra t-il un jour que le titre de « Monsieur un but par match » se mérite ?
- Aux communautés sœurs et jeunes du point G ; merci pour cette bonne cohabitation.
- Aux membres de la promotion Pr Ousmane DOUMBIA ; soyons famille.
- A Jean- Claude EWANE EPOTE, Il nous a été trop facile de nous comprendre et la logique a toujours été le fil conducteur de nos débats. Ce travail est aussi le tien. Puisse t-il refléter ton sens de la précision.
- Au cercle très fermé des numerussiens pharmaciens non nationaux à la FAPH ; Maïmouna IDI, Sandrine OMOCK, Cédric NGASSOP, Jean- Claude EWANE EPOTE, Guillaume SOUNIN, Tony ZITTI, Dr Christelle, Dr Franchard et les plus jeunes : ce fut agréable nos collaborations.
- Pour ceux non cités, parce que plus dans le cœur que dans l'esprit, sachez que ce n'est pas un oubli. Recevez mes remerciements pour votre part dans mon édification.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury,

Professeur Agrégé Flabou BOUGOUDOGO

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

Vous êtes incontestablement un maître. Merci de l'honneur que vous nous faites de présider notre jury. Veuillez trouver ici notre reconnaissance et profond respect.

A notre Maître et Juge,

Professeur Agrégé Abdel Kader TRAORE

- **Maître de Conférences Agrégé en Médecine Interne;**
- **Diplômé en communication scientifique médicale ;**
- **Point focal du Réseau en Afrique Francophone pour la Télémédecine (RAFT) au Mali ;**
- **Référent académique de l'Université Numérique Francophone Mondiale (UNFM) au Mali ;**
- **Ancien Directeur du Centre National d'Appui à la lutte contre la Maladie (CNAM).**

Vous nous honorez en acceptant d'examiner notre travail. La clarté et la densité des enseignements que vous nous avez dispensés, nous ont vraiment impressionné. Retrouvée ici exprimée toute notre admiration.

A notre Maître et Juge,

Dr Ibrahim NIENTAO

- **Diabétologue au Centre National de Lutte contre le Diabète (CNLD) ;**
- **Coordinateur médical et scientifique de l'ONG Santé Diabète ;**
- **Président d'honneur de l'Association des Jeunes Diabétiques du Mali.**

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites d'accepter d'examiner notre travail. Nous avons été impressionné par votre dynamisme et votre simplicité. Retrouvez ici l'assurance de notre profond respect

A notre Maître et Juge,

Dr Madiassa KONATE

- **Chirurgien au Centre Hospitalier Universitaire Gabriel Touré ;**
- **Praticien hospitalier.**

Nous ne vous remercierons jamais assez du dynamisme avec lequel vous avez accepté de juger notre travail. Recevez cher maître, l'expression de notre profond respect.

A notre Maître et Juge,

Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA

- **Maître de Conférences Agrégé d'immunologie ;**
- **Responsable de l'enseignement d'immunologie à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Chef de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP ;**
- **Directeur Scientifique du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) de Bamako ;**
- **Président de la Société Malienne d'Immunologie.**

Cher maître, c'est un réel plaisir et un honneur pour nous de vous compter parmi les membres du jury. Votre rigueur, votre simplicité et votre disponibilité ont été d'un grand apport. Trouvez ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A notre Maître et Directeur de thèse,

Professeur Souleymane DIALLO II

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

Cher maître, vous nous avez fait honneur en nous acceptant dans votre service. Dans notre besogne nous avons hautement apprécié votre disponibilité à nous suivre et appris la dextérité dans la pratique. Pour cet exemple de rigueur, de précision que vous incarné ; ajouté à cette disponibilité et densité intellectuelle qui vous caractérisent, recevez l'expression de notre profond respect.

SOMMAIRES

LISTE DES MEMBRES DE L'ADMINISTRATION ET DU CORPS ENSEIGNANT A LA FACULTE DE PHARMACIE…….I

DEDICACES……...…VII

REMERCIEMENTS……...IX

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY……...XVI

SOMMAIRES……...…XXII

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS……..……...XXV

LISTE DES TABLEAUX……..…XXVII

LISTE DES FIGURES……XXVIII

1. **INTRODUCTION……...……..……1**
2. **OBJECTIFS……...……...…4**
3. **GENERALITES…….……5**
   - **3.1. DEFINITIONS…….……6**
   - **3.2. MECANISME DE SURVENUE DE PLAIES DIABETIQUES……...10**
   - **3.3. INFECTIONS DE PLAIES DIABETIQUES…….…..…….....……11**
   - **3.4. FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES : MODE D'ACTION – MECANISMES DE RESISTANCE…….....17**
   - **3.5. ANTIBIORESISTANCE…….....……23**
   - **3.6. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE BACTERIENNE…….……..25**
4. **METHODOLOGIE…….…….29**
   - **4.1. PRESENTATION SOMMAIRE DU MILIEU PHYSIQUE…….29**
   - **4.2. CADRE D'ETUDE…….....…….....32**
   - **4.3. TYPE ET PERIODE D'ETUDE…….…….32**
   - **4.4. POPULATION DE L'ETUDE……...…….34**
   - **4.5. COLLECTE DES DONNEES……....……34**
   - **4.6. ANALYSE ET TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNEES…...……..34**

4.7. AUTRES MATERIELS AYANT PERMIS L'ETUDE……..35

4.8. MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DE PUS PROVENANT DE PLAIES DIABETIQUES AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX……..……39

5. RESULTATS……47

5.1. RESULTATS GLOBAUX…….…….....…48

5.2. RESULTATS SUR LA RESISTANCE BACTERIENNE……...…..55

5.3. MULTIRESISTANCE BACTERIENNE …..……..……..59

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION……..…63

6.1. NATURE DES PRELEVEMENTS DE PUS ANALYSES AU LRM…….…...64

6.2. ORIGINE ET RESULTATS A LA CULTURE DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES ANALYSES AU LRM……..64

6.3. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES INFECTES……...……..…65

6.4. SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES INFECTES……..….…..65

6.5. ANTIBIOGRAMME ET NIVEAU DE RESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES AU LRM DE JANVIER A DECEMBRE 2013…….....66

6.6. MULTIRESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PUS DIABETIQUES AU LRM DE JANVIER A DECEMBRE 2013.....70

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS…….…….72

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES…….…….…….74

ANNEXES……..……...……i

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ATB : Antibiotique.

BGN: Bacille Gram Négatif.

BLSE : Bêta-Lactamase à Spectre Elargi ou Etendu.

BMR : Bactérie multirésistante.

C1G : Céphalosporine de première génération.

C2G : Céphalosporine de deuxième génération.

C3G : Céphalosporine de troisième génération.

CICM : Centre d'Infectiologie Charles Mérieux.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DCI : Dénomination Commune Internationale.

FAPH : Faculté de Pharmacie.

FQ : Fluoroquinolones.

GN : Gram négatif.

GP : Gram positif.

I: Intermédiaire.

IV: Intraveineuse.

LPS : Lipopolysaccharide.

LRM : Laboratoire Rodolphe Mérieux.

MLS : Macrolides, Lincosamides et Streptogramines.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

PLP : Protéine liant les pénicillines.

R : Résistante

S : Sensible

SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline.

UFC : Unité Formant Colonie.

TEM : D'après Temoniera : nom du patient chez qui la première souche a été isolée.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Répartition des structures sanitaires par type et par région en 2011……**32**

Tableau II : Distribution des prélèvements de pus analysés au LRM de janvier à décembre 2013 …….....**48**

Tableau III : Répartition des prélèvements de pus désignés « non diabétiques » analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'organe atteint.....**49**

Tableau IV : Répartition des souches bactériennes isolées des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'espèce.....**52**

Tableau V : Fréquence d'associations des germes isolés des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013.....**54**

Tableau VI : Niveau de résistance aux antibiotiques testés de *Staphylococcus aureus* isolées des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013.....**55**

Tableau VII : Niveau de résistance aux antibiotiques testés de *Escherichia coli* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013.....**56**

Tableau VIII : Niveau de résistance aux antibiotiques de *Proteus mirabilis* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013.....**57**

Tableau IX : Niveau de résistance aux antibiotiques testés de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013.....**58**

Tableau X : Répartition des germes isolés de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur capacité à produire des BLSE.....**60**

Tableau XI : Proportion de germes producteurs de BLSE au sein des souches bactériennes productrices isolées au LRM de janvier à décembre 2013…….……..**61**

Tableau XII : Distribution générale des souches bactériennes isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon qu'elles soient multirésistantes (BMR) ou non.....**61**

Tableau XIII : Proportion de multi résistance au sein des espèces bactériennes multi résistantes isolées au LRM de janvier à décembre 2013……**62**

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Carte géographique du Mali……30

Figure 2 : Image de Bamako……..……..31

Figure 3 : Automate VITEK® 2 Compact……..…….....35

Figure 4 : Automate mini API®……..……37

Figure 5 : Distribution mensuelle des demandes d'analyses de pus au LRM……..……....48

Figure 6 : Relation entre origines des prélèvements et résultats à la culture des prélèvements de pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013.....50

Figure 7 : Répartition des patients présentant des pus infectés analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'âge.....51

Figure 8 : Répartition des prélèvements de pus diabétiques positifs à la culture et analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon le nombre de germes identifiés…….53

Figure 9 : Répartition des *Staphylococcus aureus* isolées de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur résistance à la méticilline…….…...59

Figure 10 : Répartition des *Staphylococcus aureus* isolées de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur résistance à la vancomycine.....58

Figure 11 : Répartition des bactéries productrices de BLSE isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon les espèces.....60

Figure 12 : Distribution générale des BMR isolées des pu diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon les espèces.....61

1. INTRODUCTION

INTRODUCTION

La découverte des antibiotiques a constitué un évènement majeur dans l'histoire de la médecine ; leur usage a augmenté l'espérance de vie moyenne d'une quinzaine d'années, en comparaison, un traitement qui guérirait 100% des cancers, n'allongerait l'espérance de vie que de 5 ans **[1]**.

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. Toutes les espèces ou germes bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant, parfois de véritables problèmes thérapeutiques **[2]**. La résistance aux antimicrobiens est devenue un problème important dans le monde **[3].** Elle se diffuse rapidement parmi de nombreux agents pathogènes aussi bien nosocomiaux que communautaires **[4]**.

Les bactéries multirésistantes qui cumulent de nombreuses résistances acquises posent des problèmes particuliers par leur fréquence et leurs conséquences thérapeutiques, tant à l'hôpital (*Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline, *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE, *Pseudomonas aeruginosa* résistants à l'imipénème) que dans la communauté (pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline) **[5].** Une surveillance de la résistance bactérienne est plus que nécessaire pour limiter la diffusion des résistances, élaborer des schémas d'antibiothérapie appropriés et ainsi éviter des situations d'impasse thérapeutique**.**

En Europe les bactéries résistantes aux antibiotiques causent 400.000 infections par an avec au moins 25000 morts annuels **[6]**. En Afrique ce phénomène de résistance est mal évalué. Toutefois, des études rapportent que le continent africain n'est pas en marge du phénomène **[7]**.

Au Mali si les maladies infectieuses bactériennes constituent un problème de santé publique, l'absence d'enquête nationale sur la résistance bactérienne aux antibiotiques en est un autre. On note également une absence de procédures opératoires standards et donc une prescription non consensuelle en matière d'antibiothérapie **[8]**.

Les diabétiques sont exposés à différentes complications, qui constituent la gravité même de leur maladie. En ce qui concerne les lésions du pied, qui s'infectent et se gangrènent très facilement chez le diabétique, les études concordent sur l'observation que le risque d'amputation chez les patients diabétiques est 15 à 20 fois plus élevé que dans la population

générale. Il se trouve que le terrain diabétique est particulièrement favorable aux infections **[9]**. Quinze à vingt pour cent des diabétiques développent une ulcération du pied au cours de leur vie, et 40% à 80% de ces pieds s'infecteront. Les estimations indiquent que 5 à 10% des diabétiques de type 1 seront amputés d'un orteil, d'un pied ou d'une jambe du fait d'une infection **[10]**. Si la découverte de l'insuline en 1921 a permis d'améliorer significativement, la prise en charge du diabète, les résistances bactériennes demeurent une préoccupation majeure parce qu'elles sont susceptibles d'aggraver le pronostic fonctionnel voire vital de ces patients.

Il est donc nécessaire de surveiller la sensibilité aux antibiotiques des bactéries associées aux infections chez les patients diabétiques afin d'améliorer leur prise en charge thérapeutique. Nous avons conduit cette étude au Laboratoire Rodolphe Mérieux du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux dans le but de mettre en place la surveillance de la résistance des bactéries associées aux infections chez les patients diabétiques à Bamako.

2. OBJECTIFS

OBJECTIFS

2.1. OBJECTIF GENERAL

Mettre en place une surveillance des bactéries multi résistantes aux antibiotiques fréquemment isolés lors d'infections de plaies diabétiques au Laboratoire Rodolphe- Mérieux (LRM).

2.2. OBJECTIFS SPECIFIQUES

- Déterminer la fréquence de pus d'origine diabétique sur l'ensemble des pus traités au LRM;
- Identifier les bactéries associées aux plaies diabétiques au LRM;
- Etudier la sensibilité des bactéries isolées des plaies diabétiques au LRM;
- Identifier les phénotypes de résistance aux antibiotiques des bactéries associées aux plaies diabétiques au LRM;
- Evaluer la capacité du LRM à participer à la surveillance de résistance.

3. GENERALITES

GENERALITES

3.1. DEFINITIONS

- **Diabète**

Le diabète est une affection métabolique caractérisée par la présence d'une hyperglycémie chronique résultant d'une déficience de sécrétion d'insuline, d'anomalies de l'action de l'insuline sur les tissus cibles, ou de l'association des deux (OMS).

L'OMS, dans la dernière révision des critères diagnostiques en 1999 **[11]**, indique que le diagnostic du diabète peut être retenu dans quatre situations différentes.

- Existence de symptômes de diabète : polyurie, polydipsie, amaigrissement et glycémie sur plasma veineux ≥ 2,00g/l (11,1 mmol/l) ;
- Glycémie (sur plasma veineux) à jeun ≥ 1,26 g/l (7,0 mmol/l) après deux glycémies veineuses ;
- Glycémie (sur plasma veineux) mesurée n'importe quand ≥ 2,00 g/l ;
- Glycémie (sur plasma veineux) deux heures après injection de 75g de glucose [test d'hyperglycémie provoquée orale (HGPO)] ≥ 2,00g/l (11,1 mmol/l).

- **Infection du pied du diabétique**

L'infection du pied du diabétique est définie par une invasion avec multiplication de micro-organismes, dans la majorité des cas, des bactéries entraînant des dégâts tissulaires avec ou sans réponse inflammatoire de l'organisme, secondaire en règle à une plaie cutanée **[12]**.

- **Pied diabétique**

Le terme « pied diabétique » regroupe l'ensemble des affections atteignant le pied, directement liées aux répercussions du diabète. Il est le siège de macérations fréquentes, expliquant, le risque d'infections bactériennes et mycosiques, d'autant que la structure particulière du pied, avec ses trois compartiments, permet une propagation facile et rapide du processus infectieux **[13]**.

- **Pus ou suppurations**

Une suppuration est due à l'évolution spontanée d'une infection à germes pyogènes. Elle provient d'une collection purulente (abcès), qui peut être superficielle comme dans le cas d'un

furoncle (inflammation d'un follicule pilosébacé produite par un staphylocoque) ou d'un abcès de la gencive, ou profonde et localisée alors dans un viscère (foie, poumon, cerveau, rein), suppuration qui ne se résorbe pas et qui s'écoule soit spontanément par l'intermédiaire d'une fistule (canal pathologique) vers la peau ou dans un organe voisin, soit par ouverture chirurgicale **[14]**. C'est l'échantillon à traiter au laboratoire en cas d'infection de plaie diabétique.

- **Antibiotique**

L'antibiotique est une substance chimique élaborée par des micro-organismes, le plus souvent des champignons inférieurs qui ont le pouvoir de s'opposer à la multiplication des germes microbiens en inhibant leur multiplication (effet bactériostatique) ou en les détruisant (effet bactéricide) **[15]**.

- **Résistance bactérienne : naturelle et acquise**

Une bactérie est dite résistante à un antibiotique lorsque les taux nécessaires à inhiber sa croissance *in vitro* sont supérieurs aux taux qui peuvent être couramment atteints *in vivo*. On parle alors de résistance bactérienne quand un micro-organisme s'adapte au milieu et réussit à modifier son métabolisme pour continuer à se développer en présence de l'antibiotique qui devrait le détruire. Il existe deux types de résistance : la résistance naturelle et la résistance acquise **[16]**.

➢ **La résistance naturelle**

Certaines bactéries ont la capacité naturelle de se développer en présence de certains antibiotiques : c'est la résistance naturelle qui définit le spectre d'activité théorique qui est l'ensemble des germes sensibles à l'antibiotique.

Les bactéries à Gram négatif résistent naturellement à la pénicilline G.

➢ **La résistance acquise**

Il peut arriver que certaines bactéries sensibles à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques au départ, deviennent résistantes à celui-ci : c'est la résistance acquise qui définit le spectre d'activité clinique. Elle n'apparaît que chez quelques souches d'une espèce normalement sensible.

Des souches de Staphylocoques normalement sensibles à la pénicilline, peuvent devenir résistantes à celle-ci par suite de production d'une enzyme : la pénicillinase qui hydrolyse le noyau bêta lactame rendant ainsi la molécule inactive **[17]**.

- **Souches bactériennes catégorisées**

Trois catégories cliniques ont été retenues pour l'interprétation des tests de sensibilité *in vitro* : Sensible (S), Résistant (R) et Intermédiaire (I).

- **Les souches catégorisées S** sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est forte dans le cas d'un traitement par voie systémique avec la posologie recommandée dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP), rédigé par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS).
- **Les souches catégorisées R** sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.
- **Les souches catégorisées I** sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches :
    - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie S. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;
    - peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie R, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues) ;

La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques **[18]**.

- **Bactéries multirésistantes (BLSE et SARM)**

La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est l'image la plus grave de la résistance car elle réduit notablement les possibilités thérapeutiques. 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 **[19]**.

- **Bêtalactamase à spectre élargi (BLSE)**

Les BLSE sont des pénicillinases codées par des gènes qui ont accumulé les modifications et ont évolué vers un élargissement du spectre de l'enzyme qui est devenu capable d'hydrolyser la presque totalité des β-lactamines connues. Les phénotypes de résistance correspondant aux pénicillinases de haut niveau et aux céphalosporines de haut niveau ne diffèrent de celui des BLSE que par le seul marqueur : la sensibilité à la ceftazidime. L'hydrolyse de la ceftazidime peut être difficile à détecter ou insuffisante *in vitro* alors que l'ensemble des céphalosporines de troisième génération sont cliniquement inactive i*n vivo*. Les céphamycines et l'imipénème restent les seules cliniquement actives **[1]**.

- ***Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)**

Le mode d'action des β-lactamines sur *Staphylococcus aureus* est dû à leur liaison aux protéines liant les pénicillines (PLP). Il y a quatre PLP chez *Staphylococcus aureus*. La résistance à la méticilline correspond à la présence d'une PLP supplémentaire, la PLP 2a qui a une très faible affinité pour l'ensemble des β-lactamines. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont donc résistants à toutes les β-lactamines **[1]**.

- **Surveillance**

La surveillance est définie dans le dictionnaire Larousse comme « l'action d'observer attentivement pour contrôler ». C'est ainsi que s'exerçait, lors des siècles derniers, la surveillance des individus placés en quarantaine afin de contrôler des maladies comme la peste ou la variole.

Au début des années cinquante, le concept a évolué sous l'impulsion des « Centers for Diseases Control and Prevention » américains et on est passé de la surveillance « passive » à la surveillance « active » des maladies dans la population.

La définition de la surveillance est alors devenue le « processus continu et systématique de collecte, de compilation et d'analyse de données de santé ainsi que leur diffusion à tous ceux qui ont contribué à la collecte et à tous ceux qui ont besoin d'être informés » **[20]**.

3.2. MECANISME DE SURVENUE DU PIED DIABETIQUE

L'infection du pied du diabétique n'est pas en cause dans l'apparition des plaies. En effet, celles- ci sont la conséquence d'un appui excessif répété de la plante des pieds et favorisé par l'insensibilité cutanée et les déformations des articulations métatarso- phalangiennes **[21]**. Les causes majeures clairement identifiées des atteintes du pied sont d'une part la neuropathie périphérique, en particulier chez les patients insulino-dépendants, et d'autre part l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, qui concerne surtout les diabétiques non insulino-dépendants. Il n'est pas rare que ces deux complications se conjuguent chez le même patient **[22]**. La plupart du temps, la plaie est d'origine mécanique : frottement d'une chaussure, blessure à partir d'un durillon (la présence d'un durillon augmente le risque d'ulcération par 11) ou d'un ongle incarné non soigné, soins de pédicurie traumatisants, coricides…La plaie passe inaperçue en raison de la neuropathie associée, qui fait disparaître le signe d'alerte qu'est la douleur. La plaie non soignée va se surinfecter, entrainant d'abord une infection des parties molles, puis par contiguïté, une infection de l'os (touchant d'abord la corticale, puis la médullaire). Toutes sortes d'objets « retrouvés » dans la chaussure peuvent entraîner une plaie chez ces patients : clou, caillou, punaise, comprimés, coton-tige, pièce de Lego, tube de rouge à lèvres…ainsi que tout autre objet pouvant être contondant. Les chaussures trop serrées peuvent entraîner des ulcérations en différents endroits. Les plus fréquents siègent sur la face dorsale des orteils en griffes, latérale sur une exostose d'hallux valgus ou sur le bord externe du pied en regard de la 5e articulation métatarso-phalangienne, ou encore dans l'espace interdigital en regard de l'articulation interphalangienne (« œil de perdrix ») **[23]**.

3.3. INFECTIONS DE PLAIES DIABETIQUES

Une fois la plaie installée, la colonisation est rapide. L'infection est favorisée par le mauvais équilibre du diabète, la mauvaise hygiène locale et les conditions déterminées par une vascularisation locale défectueuse conditionnée elle- même par la micro- angiopathie et la neuropathie diabétiques **[21]**.

Le diagnostic d'infection est parfois difficile, les éléments cliniques sont non spécifiques, les examens complémentaires d'interprétation difficile, la flore bactérienne est variée rendant difficile une proposition uniforme de traitement empirique. L'accès des antibiotiques sur le

site infectieux, élément essentiel de leur activité, est rendu mal aisé par la micro- angiopathie diabétique. D'autre part, les risques de toxicité doivent être évalués au cours de traitements susceptibles d'être très prolongés.

3.3.1. Agents causals des infections de plaies diabétiques et les résistances

Il s'agit en règle d'infections plurimicrobiennes. *Staphylococcus aureus* est la bactérie le plus souvent en cause. Les autres micro-organismes sont les streptocoques dont *Streptococcus agalactiae*, les entérocoques, les bacilles à Gram négatif dont principalement les entérobactéries et *Pseudomonas aeuruginosa* et les bactéries anaérobies présents dans 80% des cultures si les modalités des prélèvements permettent leur recherche **[10].**
Sur le plan taxonomique ces bactéries appartiennent à :

- Règne : *Bacteria ;*
- Embranchement : *Proteobacteria ;*
- Classe : *Gamma Proteobacteria ;*

Et à divers Ordres et familles.

3.3.1.1. S*taphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci Gram (+) classiquement disposés en amas. Actuellement on distingue 35 espèces et 17 sous- espèces **[24]**. L'espèce *Staphylococcus* plus communément appelée staphylocoque doré se distingue généralement des autres espèces appelées staphylocoque à coagulase négative (SCN). *Staphylococcus aureus* est un germe très important aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales **[25]**. Comme pathogène, il est responsable de suppuration, de septicémie, de bactériémies, de toxi-infection, de chocs toxiques et d'infections nosocomiales **[26]**.

3.3.1.1.1. Taxonomie

- Famille : *Staphylococcaceae ;*
- Genre : *Staphylococcus ;*
- Espèce : *aureus.*

3.3.1.1.2. Résistance aux antibiotiques

Comme toutes les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* présente une résistance naturelle à l'aztréonam, colistine et à l'acide nalidixique. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines **[27]**. La résistance

à la méticilline est un problème majeur de santé publique. Ces staphylocoques ont acquis le gène *mec* qui permet la synthèse d'une enzyme (PBP2a ou PBP2') n'ayant qu'une affinité très faible pour les β-lactamines, qui ne peuvent plus exercer leur action inhibitrice. La plupart de ces staphylocoques sont également résistants aux quinolones et aux macrolides. Les staphylocoques communautaires sont habituellement sensibles à la méticilline. Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM) sont principalement observés en milieu hospitalier **[28]**. Les souches hospitalières sont caractérisées par leur résistance aux antibiotiques notamment aux Bêtalactamines **[26]**.

3.3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

3.3.1.2.1. Taxonomie

- **Ordre :** *Pseudomonales ;*
- **Famille :** *Pseudomonadaceae ;*
- **Genre :** *Pseudomonas ;*
- **Espèces :** *aeruginosa.*

3.3.1.2.2. Résistance aux antibiotiques

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à de nombreuses classes d'antibiotiques et une facilité à développer des résistances par mutation chromosomique ou par acquisition horizontale de gènes de résistance sur plasmides, transposons, ou intégrons.

Pseudomonas aeruginosa a deux mécanismes différents qui justifient sa résistance naturelle :

- Une induction chromosomique de bêtalactamase Amp C qui la rend résistante à ampicilline, amoxicilline, amoxicilline-acide clavulanique et élargi ce spectre aux céphalosporines, céfotaxime et ceftriaxone et ;
- Les systèmes de pompe à efflux.

D'autres antibiotiques s'ajoutent aux résistances naturelles de *P. aeruginosa*. Ils incluent d'autres pénicillines notamment piperacilline et ticarcilline ; d'autres céphalosporines (ceftazidime et céfépime), les carbapénèmes (imipénème et méropénème), les monobactams (aztreonam), les fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine), Les aminosides (gentamicine, tobramycine, et amikacine), et la colistine. D'autres résistances peuvent malheureusement subvenir.

Mondialement, la résistance aux antibiotiques, incluant les multirésistances (résistance à trois ou supérieures à trois classes d'antibiotiques) de souches de *P. aeruginosa* est répandue et en grande augmentation **[29]**.

3.3.1.3. *Escherichia coli*

3.3.1.3.1. Taxonomie

- **Ordre :** *Enterobacteriales ;*
- **Famille :** *Enterobacteriaceae* ;
- **Genre :** *Escherichia* ;
- **Espèce :** *Escherichia coli*.

3.3.1.3.2. Résistance aux antibiotiques

Escherichia coli présente une résistance naturelle à : aminopénicillines, C1G, C2G, MLS, glycopeptides et une résistance acquise aux β-lactamines par production de β-lactamases (TEM, BLSE), aux FQ et aux sulfamides (cotrimoxazole) **[27]**.

3.3.1.4. *Proteus mirabilis group*

3.3.1.4.1. Taxonomie

- **Ordre :** *Enterobacteriales ;*
- **Famille :** *Enterobacteriaceae ;*
- **Genre :** *Proteus ;*
- **Espèce :** *mirabilis.*

3.3.1.4.2. Résistance aux antibiotiques

Il partage également les résistances naturelles retrouvées chez toutes les entérobactéries que sont les résistances à : pénicilline G, glycopeptides, acide fusidique, macrolides (avec quelques exceptions), lincosamides, streptogramines, rifampicine, daptomycine et linezolide. A ces résistances s'ajoutent les particularités de *P. mirabilis* que sont les résistances naturelles à tigecycline, colistine et nitrofurantoïne **[27].**

3.3.2. Physiopathologie des infections des plaies diabétiques

La porte d'entrée de l'infection de pied diabétique peut être une plaie passée inaperçue en raison de la neuropathie ou un mal perforant plantaire. Le mal perforant, complication habituelle du pied neuropathique, est constitué d'une hyperkératose au niveau des zones d'hyperpression, et peut être le siège d'une effraction cutanée qui favorise la surinfection locale. La susceptibilité accrue à l'infection est due aux perturbations immunologiques dues à l'hyperglycémie et la cétose (altération de la migration des leucocytes, de la phagocytose, de l'activité bactéricide intracellulaire). L'ischémie liée à l'artérite et la neuropathie entraîne une diminution de la vasodilatation capillaire contribuant à une moindre réponse à l'infection. Cette infection peut ensuite diffuser vers les gaines tendineuses et l'os, ceci étant favorisé par l'anatomie du pied, cloisonné en plusieurs loges **[10].**

3.3.3. Clinique des infections des plaies diabétiques

Toutes les plaies ou ulcères du pied chez le diabétique ne sont pas infectés. L'infection peut être évoquée par un aspect inflammatoire local, un écoulement purulent, la mise en évidence d'une collection. Tous les aspects peuvent être observés allant de l'infection localisée modérée à une fascite nécrosante extensive mettant en jeu la conservation du membre voire même la vie du patient par diffusion systémique. D'une manière générale ; les lésions superficielles sont de bon pronostic, les lésions profondes sont susceptibles d'engager un risque d'amputation plus ou moins étendue. Les signes généraux stigmates d'infection sont rarement observés (fièvre, frissons, hyperleucocytose). L'hyperglycémie ou plutôt la décompensation brutale du diabète est un signe de gravité d'évolutivité de l'infection **[21]**.

3.3.4. Diagnostic bactériologique

De façon habituelle les infections superficielles sont dues à des staphylocoques dorés ou à des streptocoques **[30]**. Les infections profondes avec atteinte osseuse sont souvent mixtes avec une flore associée regroupant des cocci Gram positifs aérobies, des bacilles Gram négatifs (entérobactéries : *Escherichia coli, Klebsiella spp, Proteus spp*) et des germes anaérobies (peptostreptocoques, *Bacteroides spp*) **[31,32].**

Un des problèmes principaux est l'identification du ou des germes responsables. L'écouvillonnage de la plaie ou de l'orifice doit rendre circonspect sur la responsabilité de l'agent isolé par cette méthode ; en effet, la contamination du prélèvement est fréquente. Le

curetage de l'ulcère après débridement chirurgical paraît un bon moyen. La ponction à l'aiguille avec aspiration de liquide est assez spécifique mais peu sensible **[31]**.

Enfin, la culture de fragment osseux prélevé par carottage à l'aiguille ou lors d'un geste chirurgical, assure une sécurité quant à la validité des résultats. Encore faut- il que le prélèvement ne soit pas contaminé lors des manipulations. Dans tous les cas et quel que soit le type de prélèvement, le transport en laboratoire et l'ensemencement doivent être rapide. La liaison médecin ou chirurgien et bactériologiste est la condition essentielle d'obtention de résultats exploitables pour traiter le patient avec le maximum de pertinence.

Dans le cas du traitement du pied diabétique et pour statuer sur sa durée, il est nécessaire de savoir si l'os sous- jacent est atteint. En effet, dans cette éventualité le traitement sera beaucoup plus prolongé, évitant ainsi le risque de récidive au décours de traitement trop court **[21].**

3.3.5. Traitement antibiotique

Les lésions du pied chez le diabétique imposent la mise en route d'un traitement médical qui repose sur une antibiothérapie systémique adaptée à large spectre, souvent par voie intraveineuse et prolongée en particulier lorsque le sujet présente une ostéite infectieuse. Les soins locaux sont constitués par un décapage des plaies consistant à exciser les zones mortifiées et à irriguer largement les trajets fistuleux avec des solutions contenant des antiseptiques ou des antibiotiques. Les gestes chirurgicaux plus ou moins étendus tels que la résection d'un orteil ou d'un rayon osseux (orteil plus métatarsien) sont parfois nécessaires. Il n'en reste pas moins que l'efficacité de toutes ces thérapeutiques impose d'obtenir un bon équilibre diabétique, qui conduit à réviser le traitement antidiabétique de ces malades et ce d'autant plus que la lésion du pied provoque souvent un déséquilibre du diabète sucré **[33]**.

L'antibiothérapie du pied diabétique ne fait pas toujours l'objet de consensus (indications, choix, durée), mais une mauvaise stratégie chez des patients fréquentant souvent l'hôpital, peut participer à l'émergence et la diffusion de souches bactériennes multi-résistantes. Il est donc primordial, dans le cadre de cette pathologie, de savoir restreindre l'antibiothérapie aux indications indispensables en même temps que de choisir celle-ci avec discernement **[34].**

Plutôt que des recettes qui ne s'adressent qu'à des cas particuliers, quelques grands principes sont à respecter :

- Obtenir un germe dont on peut dire avec quasi certitude qu'il est responsable de l'infection des parties molles et/ou de l'os sous- jacent. Le corollaire est d'éviter les traitements empiriques sans avoir un prélèvement local sûr.
- Traiter avec les antibiotiques bien sûr actifs *in vitro* mais ayant aussi une bonne diffusion cutanée et/ou osseuse.
- Eviter tout antibiotique toxique notamment les aminoglycosides.
- Lorsqu'il y a une infection osseuse ou une infection extensive le traitement doit être parentéral.
- La durée doit être suffisante pour éviter tout risque de récidive. Deux à trois semaines pour une infection des tissus mous, huit à dix semaines pour une infection osseuse.
- Les antibiotiques ne servent à rien s'ils n'accompagnent pas une thérapeutique chirurgicale raisonnée et un contrôle du diabète. Le traitement antibiotique s'intègre dans une stratégie **[21]**.

3.3.6. Prévention [10]

Elle consiste en l'observance des conseils suivants :

-équilibre glycémique ;

-dépistage des patients à risque podologique (antécédent d'ulcération ou d'amputation, perte de sensibilité objectivée par le test au monofilament, artériopathie, déformation des pieds) ;

-port de chaussures adaptées, en vérifiant systématiquement l'absence de tout corps étranger avant chaussage, voire chirurgie orthopédique corrective visant à assurer une bonne statique de pied et éviter la formation des zones ;

-soins de pédicure limités (ablation de l'hyperkératose, soins des ongles), mais qui peuvent être à l'origine de plaies cutanées chroniques ;

-traitement de l'ischémie, médicalement ou chirurgicalement.

3.4. FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES : MODE D'ACTION – MECANISMES DE RESISTANCE [35]

3.4.1. β-lactamines

Mécanisme d'action

Le classique mécanisme d'action des β-lactamines est fondé sur la liaison de l'antibiotique aux enzymes participant à la synthèse du peptidoglycane (constituant principal de la paroi bactérienne) : les protéines de liaison des pénicillines (PLP), ou encore « penicillin-binding-protein » (PBP). Il existe plusieurs PLP dénommées PLP1, PLP2, etc. rendant compte des différences d'activité d'une molécule à l'autre (parfois au sein même d'une sous-famille). Ces PLP ont une affinité variable vis-à-vis des différentes β-lactamines.

La conséquence de cette interaction moléculaire entre PLP et β-lactamines est l'inhibition de la biosynthèse et du remodelage du peptidoglycane par inhibition des fonctions de transpeptidation (effet bactériostatique).

Quant à l'activité bactéricide des pénicillines, on supposait qu'elle résultait de la rupture, sous la pression osmotique, de la paroi cellulaire fragilisée. Le mécanisme bactéricide est probablement beaucoup plus complexe, par interaction avec le système de régulation de l'activité des autolysines. Les β-lactamines produisent habituellement un effet bactéricide (sauf vis-à-vis des entérocoques pour lesquels l'effet n'est le plus souvent que bactériostatique : phénomène de tolérance). En dehors du cas particulier des carbapénèmes, l'activité des β-lactamines est de type « temps-dépendant », avec un effet post-antibiotique faible ou nul et un effet inoculum marqué.

En association, l'effet des β-lactamines est le plus souvent :

- Synergique avec les aminosides, aussi bien vis-à-vis des bacilles à Gram négatif que des cocci à Gram positif ;
- Additif ou indifférent avec les fluoroquinolones

Mécanismes de résistance

Trois mécanismes de résistance sont décrits :

- Une modification des protéines cibles, surtout observée chez les cocci à Gram positif (résistance à la méticilline des staphylocoques par apparition d'une nouvelle PLP de

faible affinité [PLP2a] ; diminution de sensibilité aux β-lactamines des pneumocoques) ;

- Une production d'enzymes (bêtalactamases) surtout observées chez les bacilles à Gram négatif ;
- Une diminution de la perméabilité de la membrane externe, décrite exclusivement chez les bacilles à Gram négatif.

3.4.2. Carbapénèmes

Les carbapénèmes sont des β-lactamines dont le spectre d'activité exceptionnellement large couvre la plupart des bactéries aérobies et anaérobies, des résistances acquises ayant toutefois émergé pour certaines espèces.

Mode d'action

L'imipénem modifie la synthèse de la paroi bactérienne en se fixant aux PLP (essentiellement 1 et 2, son affinité pour la PLP3 est plus faible que celle de l'ensemble des autres β-lactamines). Son activité n'est pas influencée par l'inoculum, contrairement aux autres β-lactamines. Il existe un effet post antibiotique sur les bactéries à Gram négatif.

L'ertapénem inhibe également la synthèse des parois cellulaires des bactéries après fixation aux protéines de liaison aux pénicillines (PLP). Pour *Escherichia coli*, l'affinité est la plus forte pour les PLP2 et 3.

Mécanisme de résistance

- Altération de la perméabilité par altération de porine de 45kDa, lieu de passage spécifique des carbapénèmes.
- Modification enzymatique par des carbapénémases. L'imipénem est très stable vis-à-vis des bêtalactamases plasmidiques mais peut être sensible aux bêtalactamases chromosomiques**.**

3.4.3. Aminosides

Mode d'action

Les aminosides inhibent la synthèse des protéines bactériennes.

Mécanismes de résistance

Trois mécanismes principaux de résistance aux aminosides peuvent s'associer chez une même bactérie :

- L'altération de la cible ribosomale, rare, par mutation d'origine chromosomique ;
- Le défaut de perméabilité cellulaire, par mutation chromosomique, touchant au transport actif de l'ensemble des aminosides au travers de la paroi bactérienne ;
- L'inactivation enzymatique, mécanisme le plus fréquemment rencontré et n'épargnant aucun aminoside, d'origine plasmatique, avec 3 classes d'enzymes inactivatrices : les aminoglycosides-O phosphotransférases, les aminoglycosides-O nucléotidyltransférases, les aminoglycosides-N acétyltransférases.

3.4.4. Macrolides

Mode d'action et mécanismes de résistances

Ils inhibent la synthèse des protéines en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. Ils sont habituellement bactériostatiques. La majorité des bacilles à Gram négatif est naturellement résistante aux macrolides, leur paroi bactérienne demeurant imperméable à cette famille d'antibiotiques, mais il existe une exception avec la clarithromycine, efficace sur certains bacilles à Gram négatif.

Les résistances acquises sont essentiellement en France le fait d'une modification de la cible bactérienne par l'intermédiaire d'une méthylase (mécanisme codé par le gène *Erm*). Cette méthylation du site de fixation de l'antibiotique entraîne une résistance croisée entre macrolides (M), lincosamides (L) et streptogramines B (S_B) mais pas les kétolides. Ce type de résistance constitutive ou inductible dénommé MLSB se manifeste vis-à-vis des cocci à Gram positif.

Le deuxième mécanisme de résistance (prédominant dans certains pays européens) est de type efflux, codé par le gène *mef* mais ne génère pas de résistance croisée.

3.4.5. Lincosamides

Mode d'action et mécanismes de résistance

Inhibiteurs de la synthèse des protéines au niveau de l'attachement sur le ribosome.

Les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants par imperméabilité de leurs membranes.

Chez les cocci à Gram positif, la pénétration est un phénomène passif mais les entérocoques sont naturellement résistants.

3.4.6. Synergistines

Mode d'action et mécanismes de résistance

La cible des 2 composants principaux est la sous-unité 50S du ribosome par blocage de 2 étapes de l'élongation de la chaîne peptidique. Leur synergie peut conduire à un effet bactéricide.

La plupart des bacilles à Gram négatif ont une résistance naturelle par imperméabilité de la paroi.

Les résistances acquises restent rares avec les staphylocoques, les pneumocoques ou les entérocoques.

Le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontré est une modification de la cible ribosomale.

Deux autres mécanismes sont possibles : inactivation enzymatique, phénomène d'efflux

3.4.7. Quinolones

Mode d'action

Les quinolones agissent spécifiquement sur deux enzymes cibles, l'ADN gyrase (ou topo-isomérase II) et la topo- isomérase IV, inhibent l'élongation de l'ADN bactérien et bloquent la réplication bactérienne.

Mécanisme de résistance

Il n'y a pas de résistance plasmidique transférable ni de résistance liée à une inactivation enzymatique des quinolones. La résistance acquise est liée à des mutations chromosomiques :

- Imperméabilité de la paroi par diminution de l'expression du gène codant pour les porines ;
- Réduction de l'affinité pour la cible par mutation du gène codant pour la sous-unité Gyr A de l'ADN-gyrase ou pour la sous-unité ParC de la topoisomérase IV ;
- Réduction de la concentration intrabactérienne par l'acquisition ou la surexpression d'une pompe à efflux.

Les deux premiers mécanismes entraînent, lors de l'exposition aux quinolones, l'émergence de résistance à l'ensemble des molécules de cette classe.

Les taux de mutation varient selon les espèces, et la sélection des mutants résistants est favorisée par des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. La modification d'une des deux cibles est responsable d'un bas niveau de résistance pour certaines fluoroquinolones, alors que pour atteindre un haut niveau de résistance, l'addition de mutations dans la seconde cible est nécessaire.

Le risque de sélectionner des mutants résistants est plus élevé pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* que pour les entérobactéries. Aussi, l'utilisation des fluoroquinolones en monothérapie doit être proscrite pour les infections dues à ces micro-organismes, surtout en début de traitement lorsque l'inoculum bactérien est élevé.

3.4.8. Polypeptides (Colistine ou polymyxine E)

Mode d'action

Effet bactéricide par détersion de la membrane externe des bacilles à Gram négatif et de la membrane cytoplasmiques des bactéries.

Les polymyxines ne sont actives, du fait de leur mode d'action, que sur *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* et sur les entérobactéries sauf *Proteus*, *Providencia* et *Serratia*. Elles sont inactives sur les bactéries à Gram positif et les cocci à Gram négatif. Les résistances acquises sont exceptionnelles.

3.4.9. Acide fusidique

Mode d'action et mécanismes de résistance

Il inhibe l'élongation au niveau du ribosome, arrêtant ainsi la synthèse protéique.

3.4.10. Fosfomycine

Mode d'action et mécanismes de résistance

Pour agir, la fosfomycine doit pénétrer dans la bactérie en utilisant des systèmes de transport : l'un, constitutif (L-glycérophosphate) et l'autre, inductible (hexoses monophosphates). Ce dernier ne fonctionne qu'en présence d'un inducteur comme le glucose-6-phosphate et semble être le système prédominant, notamment pour *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Providencia*. Ces mécanismes expliquent la fréquence élevée d'apparition de mutants**.**

3.4.11. Sulfamethoxazole + Trimethoprime (Cotrimoxazole)

Le sulfaméthoxazole (SMX), bactériostatique par inhibition de la synthèse microbienne de l'acide folique, agit en synergie avec le triméthoprime (TMP), inhibiteur de la déhydrofolate réductase microbienne, l'association étant synergique sur les souches sensibles aux deux composés**.**

3.4.12. Nitrofuranes

Mode d'action complexe, les nitrofuranes interagissent avec l'ARN ribosomal et l'ADN des bactéries.

3.4.13. Oxazolidinones

Le linézolide est le premier représentant d'une classe d'antibiotiques récente, les oxazolidinones.

Mode d'action et mécanismes de résistance

Ils agissent par inhibition sélective de la synthèse des protéines bactériennes en bloquant au niveau du ribosome la formation du complexe d'initiation 70S.

Il n'y a pas de résistance croisée avec les autres antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram positif**.**

3.4.14. Cyclines et Glycyclines

Mode d'action

Les cyclines sont des antibiotiques à large spectre, bactériostatiques. En se liant à la sous-unité 30S du ribosome, elles inhibent la synthèse protéique. La minocycline et la doxycycline sont les molécules les plus actives *in vitro* et les plus utilisées en clinique.

Le développement de résistances par des microorganismes banals (efflux, sous l'influence du gène plasmidique *Tet*, et protection du ribosome) explique que les cyclines ne soient plus utilisées pour les infections courantes mais pour des indications ciblées telles que les infections à germes intracellulaires.

La tigécycline est moins affectée par ces mécanismes de résistance.

3.5. ANTIBIO-RESISTANCE [36]

Les enquêtes épidémiologiques conduites selon une méthode rigoureuse sont rares dans les pays en développement car les techniques d'échantillonnage et les définitions de la méthode d'évaluation de la résistance sont rarement précises. Des études décrivent la résistance pour des souches isolées à l'hôpital de pathologies pas toujours bien définies, si bien que leur représentativité prête à caution. Bien souvent, il s'agit de patients pré-traités ; les bactéries correspondent alors à la sélection des bactéries responsables d'échecs ou de portages**.**

L'antibio-résistance est un problème mondial dont l'évaluation est fonction des moyens épidémiologiques mis en œuvre. L'antibio-résistance traduit, d'une part, la capacité de certaines espèces bactériennes à acquérir un ou plusieurs mécanismes de résistance et, d'autre part, la capacité du clone résistant à se répandre dans l'environnement et/ou à coloniser et

infecter la population. L'antibio-résistance est la conséquence du mésusage des antibiotiques et d'une hygiène insuffisante.

3.5.1. Facteurs de résistance

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant un mécanisme vital. La mise en contact d'une population de bactéries avec un antibiotique peut provoquer la sélection d'un mutant spontané pré-existant, ce qui est d'autant plus probable que la population bactérienne est importante. Ce risque de sélection de mutant est plus fréquent pour certains antibiotiques : rifampicine, fosfomycine, acide fusidique, fluoroquinolones. L'induction d'un mécanisme pré-existant est aussi possible. Pour les antibiotiques agissant sur la synthèse de paroi, la bactérie peut se mettre en métabolisme ralenti (bactérie quiescente), ce qui la rend moins accessible à l'effet antibiotique, ce qui est fréquent pour les espèces infectant un matériel étranger.

3.5.2. Mécanismes généraux de résistance

Quatre principaux mécanismes de résistance sont décrits mais leur répartition est très inégale. La production d'enzymes d'inactivation est la plus fréquente : β-lactamase, methylase, adenylase, etc. La modification des protéines cibles de l'antibiotique (PLP pour les β-lactamines), les modifications de porines ne permettant plus la pénétration de l'antibiotique dans la bactérie ou le mécanisme d'efflux permettant le rejet de l'antibiotique ayant pénétré sont moins fréquents.

En général, la résistance a un coût pour la bactérie qui diminue sa capacité réplicative. Si un mécanisme compensatoire n'est pas trouvé par la bactérie pour maintenir sa capacité réplicative, la résistance a tendance à ne plus être exprimée. Par contre, si la bactérie dispose de ce mécanisme, la résistance va se maintenir. La résistance n'est donc pas obligatoirement définitive. Elle aura tendance à se maintenir si la pression de sélection dure par l'exposition aux antibiotiques. Les politiques de bon usage sont d'actualité pour diminuer la pression de sélection. Lorsqu'un ou plusieurs mécanismes de résistance sont sélectionnés, ils peuvent se répandre dans la population bactérienne, voire passer d'une espèce à l'autre par des plasmides qui sont des séquences circulaires d'ADN indépendamment de l'ADN bactérien. Certaines séquences codant pour un ou plusieurs antibiotiques peuvent s'intégrer (transposon). Par ailleurs, il est maintenant démontré que les concentrations sub-inhibitrices (sub-CMI) peuvent révéler un mécanisme de résistance *in vitro* plus ou moins rapidement selon les antibiotiques

et les espèces bactériennes. Certains antibiotiques peuvent donc être considérés plus à risque que d'autres. Leur utilisation devrait faire l'objet de recommandations restrictives. Les sub-CMI sont assez fréquentes *in vivo* : posologie insuffisante et mauvaise observance, ce qui favorise l'émergence de bactéries résistantes, problème particulièrement important dans les pays pauvres et/ou très consommateurs d'antibiotiques et/ou dans lesquels le mésusage est fréquent : sous-dosage, durée de traitement insuffisante, antibiotique prescrit mal choisi faute de disposer d'un antibiogramme**.**

3.6. SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE BACTERIENNE [37]

La surveillance en laboratoire de la résistance aux antimicrobiens, composante essentielle du renforcement du système de santé, doit être développée car elle est utile à l'amélioration de la prestation des soins, tout comme à la prévention et au contrôle de la maladie. En outre, la stratégie mondiale de l'OMS pour endiguer la résistance aux antimicrobiens érige la surveillance en laboratoire de la pharmacorésistance au rang de priorité fondamentale pour l'élaboration de stratégies visant à endiguer la résistance aux antibiotiques et pour l'évaluation de l'impact des interventions.

3.6.1. Eléments d'un système de surveillance en laboratoire de la résistance aux antimicrobiens (RAM)

La surveillance est la stratégie primordiale pour dépister l'émergence de la pharmacorésistance au sein de la population, qui permet de prendre rapidement les mesures jugées nécessaires.

- Les laboratoires nationaux chargés de la surveillance de la pharmacorésistance doivent être dotés de techniciens, de scientifiques et de pathologistes qualifiés.
- Ces laboratoires doivent posséder des instruments et produits consommables appropriés pour produire des données fiables visant à soutenir la surveillance de la pharmacorésistance.
- L'information générée doit être régulièrement communiquée aux parties prenantes et aux autorités nationales pour les aider à prendre des décisions en connaissance de cause.

En outre, tout laboratoire souhaitant s'acquitter parfaitement de ses responsabilités en matière d'isolement, d'identification et de test de la sensibilité aux antimicrobiens doit investir en permanence dans l'acquisition de fournitures, de milieux de culture et de réactifs, veiller au contrôle de la qualité, fournir une formation périodique à son personnel et mener des évaluations externes de la qualité ou des tests d'aptitude.

3.6.2. Les exigences d'une surveillance en laboratoire

La surveillance en laboratoire doit répondre à plusieurs exigences :

- Classer par ordre de priorité les organismes qui doivent être surveillés, en tenant compte de la charge de morbidité du pays ;
- Sélectionner les antibiotiques à tester pour chaque isolement, compte tenu de la liste de médicaments essentiels et des guides thérapeutiques ;
- Elaborer ou mettre à jour des modes opératoires normalisés pour l'isolement, l'identification et le test de la sensibilité aux antimicrobiens des agents pathogènes sélectionnés en utilisant des méthodes normalisées ;
- Etablir ou renforcer des systèmes de qualité dans les laboratoires ;
- Créer une base de données pour la collecte et le partage d'informations avec les parties prenantes.

3.6.3. Les manquements fréquemment observés

L'accès à des résultats de laboratoire exacts en ce qui concerne les tests de sensibilité aux antimicrobiens est un obstacle de taille que les laboratoires de santé publique doivent surmonter dans la Région africaine. Il existe peu de données exactes et fiables sur la RAM.

Par ailleurs, l'OMS et le National Institute for Communicable Diseases (NICD, Afrique du Sud) ont mené récemment une évaluation externe de la qualité des laboratoires nationaux de santé publique en Afrique. Cette étude a mis en évidence la carence de plusieurs pays à effectuer des tests de sensibilité aux antimicrobiens. Un petit nombre de laboratoires seulement réalise le test de concentration minimale inhibitrice lorsque l'antibiogramme par la méthode des disques s'avère peu fiable concernant la pénicilline G pour *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae*.

Les autres problèmes importants liés à la capacité des laboratoires à surveiller la RAM dans la Région africaine de l'OMS comprennent le manque de réactifs essentiels comme les souches de contrôle ATCC (American Type Culture Collection) pour vérifier la qualité des tests de sensibilité aux antimicrobiens, la capacité insuffisante pour analyser et diffuser les résultats de ces tests, l'inadéquation de la formation reçue par les personnels qui effectuent et interprètent ces tests, le manque de lignes directrices nationales sur l'utilisation des antimicrobiens, et la faiblesse des programmes nationaux sur la RAM**.**

4.METHODOLOGIE

METHODOLOGIE

4.1. PRESENTATION SOMMAIRE DU MILIEU PHYSIQUE

4.1.1. Caractéristiques géographiques du Mali

source : www.afrique-planète.com

Figure 1 : Carte géographique du Mali

Ancienne colonie française du Soudan français, le Mali est devenu indépendant le 22 septembre 1960, après l'éclatement de la Fédération du Mali regroupant le Sénégal et le Soudan français. Sa devise est « un peuple, un but, une foi » et son drapeau est constitué de trois bandes verticales verte, jaune et rouge.

Le Mali, officiellement République du Mali, est un pays enclavé d'Afrique de l'Ouest situé entre les 10e et 25e degrés de latitude nord et entre le 4e degré de longitude est et le 12e de longitude ouest et couvre une superficie de 1 241 238 km². Il partage 7 420 km de frontières avec 7 pays limitrophes : l'Algérie au nord, le Niger et le Burkina Faso à l'est, la Côte d'Ivoire, la Guinée au sud, la Mauritanie, et le Sénégal à l'ouest.

La population, s'élevant à environ 14,5 millions d'habitants en 2009 ; **15 968 882habitants (estimation juillet 2013)**, est essentiellement rurale. Les principales villes sont Bamako, la capitale, Kati, Kayes, Ségou, Mopti, Gao, Tombouctou, Kidal et Sikasso.

Le pays fait partie de la Communauté économique des États de l'Afrique de l'Ouest (CEDEAO) et de l'Union africaine.

Bamako, ville située au sud-ouest du pays est la capitale du pays.

4.1.2. Présentation de Bamako

Figure 2 : Image de Bamako

Bamako est la capitale du Mali, sur le fleuve Niger, dans le sud-ouest du pays. En 2009, la ville compte 1 809 106 habitants ; 1926748 habitants, appelés Bamakois. Son rythme de croissance urbaine est actuellement le plus élevé d'Afrique (et le sixième au monde). Bamako est le centre administratif du pays, un important port fluvial et un centre commercial pour toute la région. La capitale Bamako est érigée en district et subdivisée en six communes dirigées par des maires élus **[38]**.

4.1.3. Caractéristiques sanitaires du Mali

Tableau I : Répartition des structures sanitaires par type et par région en 2011 **[39]**

REGION	Ka	Ko	Si	Sé	Mo	To	Ga	Ba	Ki	Total
CSCOM	197	180	206	179	153	85	65	59	11	**1135**
CSRef	7	9	9	8	8	5	4	6	4	**60**
Hôpital	1	1	1	1	2	1	1	7	-	**15**
Polyclinique	1	2	-	-	-	-	-	7	-	**10**
Clinique	4	9	15	7	-	-	1	68	-	**104**
Cabinet	37	58	22	18	8	4	-	184	1	**332**
CMIE	4	4	6	2	1	2	2	7	-	**28**
Infirmerie de garnison	3	4	1	3	3	1	2	2	2	**21**
Confessionnel	7	3	9	4	4	-	-	8	-	**35**
Officine de Pharmacie	38	82	50	54	22	4	10	211	-	**471**
Laboratoire d'analyses médicales	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**8**	**-**	**8**
Imagerie Médicale	-	-	1	-	-	-	-	4	-	**5**
Ecoles de santé	7	10	12	9	4	1	2	27	-	**72**
Tradithérapeute	-	6	-	9	-	-	-	12	-	**20**
Centre de santé mutualiste	-	1	-	-	-	-	-	7	-	**8**
Dépôts de pharmacie	6	14	1	4	1	-	-	1	-	**27**
CSCOM NON FONCTIONNEL	-	6	-	-	-	3	1	3	-	**13**
Centre de Recherche	-	-	-	-	1	-	-	5	-	**6**
Autres	-	1	-	-	-	-	-	3	-	**4**
Total général	**312**	**390**	**333**	**291**	**207**	**106**	**88**	**629**	**18**	**2374**

Ka :kayes ;Ko :Koulikoro ; Si :Sikasso ;Sé :Ségou ; Mo :Mopti ; Tombouctou ; Ga :Gao ;Ba :District de Bamako ; Ki : Kidal

4.2. CADRE D'ETUDE

Le Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (C.I.C.M) 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.

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

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

Le CICM comprend :

- une administration générale.
- un centre de formation avec une formation diplômante le BAMS (Bachelor de Biologie Médicale Appliquée), 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 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).

L'organigramme du Centre d'infectiologie Charles Mérieux de Bamako est en annexe de ce document. (Cf annexe n°1)

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).

Le niveau d'équipement du Laboratoire Rodolphe Mérieux pour la microbiologie au Laboratoire 2 où s'est déroulée notre étude est comme suit :

- Deux (2) étuves de marque JOUAN ;
- Une (1) plaque chauffante de marque STUART ;
- Une (1) centrifugeuse de marque JOUAN ;
- Un (1) réfrigérateur de marque LIEBHERR pour la conservation des milieux de culture préparés (+ 5 degrés Celsius) ;
- Un (1) réfrigérateur de marque LIEBHERR pour la conservation des réactifs (+ 5 degrés Celsius) ;
- Un (1) congélateur de marque SANYO pour la conservation des souches de BMR isolée (-85 degrés Celsius) ;
- Deux (2) microscopes optiques de marque Leica ;
- Une (1) hotte de bactériologie à flux laminaire de marque JOUAN ;
- Un (1) autoclave pour la stérilisation de la verrerie, et pour la préparation des milieux de culture ;
- Un (1) automate VITEK® 2 COMPACT de marque BIOMERIEUX (pour la réalisation des identifications de souches bactériennes et des antibiogrammes) ;
- Un (1) automate mini API® de marque BIOMERIEUX (pour la réalisation des identifications de souches bactériennes et des antibiogrammes).

4.3. TYPE ET PERIODE D'ETUDE

C'est une étude transversale, prospective et descriptive portant sur les pus provenant de plaies diabétiques et analysés au Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako, du 1er janvier 2013 au 31décembre 2013.

4.4. POPULATION D'ETUDE :

Notre étude s'est intéressée uniquement aux souches bactériennes isolées des pus diabétiques analysés pendant la période d'étude.

4.4.1. Critères d'inclusion

Ont été incluses dans notre étude, les souches bactériennes isolées des pus provenant de plaies diabétiques, analysés au Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) et ayant fait l'objet d'un antibiogramme quelque soit la provenance du prélèvement.

4.4.2. Critères de non inclusion

N'étaient pas incluses dans notre étude, toutes les souches bactériennes non isolées des pus provenant de plaies diabétiques ou n'ayant pas fait l'objet d'un antibiogramme.

4.5. MATERIELS AYANT PERMIS L'ETUDE :

4.5.1. Les Automates :

4.5.1.1. L'automate VITEK® 2 Compact :

Figure 3: Automate VITEK® 2 Compact. (Photo prise au LRM le 10/06/2014)

L'automate VITEK® 2 Compact de bioMérieux est utilisé pour l'identification des bactéries et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques.
Dans le cadre de notre travail, nous avons utilisé les cartes d'identification des bactéries Gram négatif (Carte GN) et des bactéries Gram positif (Carte GP) ainsi que les cartes servant de réalisation des antibiogrammes (Carte AST) ; des cartes essentielles au fonctionnement de l'automate.

- **Cartes GN et GP :**

Elles servent à l'identification des germes à Gram négatif et Gram positif fréquemment rencontrés en microbiologie clinique.
Comme expliqué dans le manuel de VITEK® 2 Compact, Information produit de bioMérieux (2006), les cartes GN et GP font appel à des tests biochimiques conventionnels et des substrats mesurant l'utilisation des sources de carbone, l'activité enzymatique et la résistance.

Les cartes GN et GP comptent chacune plus de 40 tests biochimiques.
Les résultats définitifs sont obtenus en 10 heures maximum pour les germes à Gram négatif.

L'identification avec le système VITEK® 2 Compact est réalisée selon les données et les connaissances sur le germe et les réactions en cours d'analyse. En effet, une quantité suffisante de données concernant des souches connues ont été recueillies pour estimer les réactions typiques d'espèces pour un ensemble de tests biochimiques discriminant.

- **Cartes AST :**

Les cartes AST sont utilisées pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques des germes fréquemment rencontrés en microbiologie clinique.

Différentes cartes existent en fonction du type de germe :

- AST-N222 pour les bacilles à Gram négatif non-fermentatifs
- AST-N233 pour les entérobactéries
- AST-P580 pour les staphylocoques

Voici les informations qui figurent dans le manuel de VITEK® 2 Compact, Information produit de bioMérieux (2006) :

Le principe de l'antibiogramme de VITEK® 2 Compact fait appel à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). […]

Chaque carte AST de VITEK® 2 Compact contient 64 micro puits. Un puits de contrôle contenant uniquement un milieu de culture est présent sur toutes les cartes ; les autres puits contiennent des concentrations préétablies d'un antibiotique donné et un milieu de culture.

4.5.1.2. L'automate mini API®

Figure 4: Automate mini API®. (Photo prise au LRM le 10/06/2014)

L'automate mini API® de bioMérieux est utilisé pour l'identification des bactéries et la détermination de leur sensibilité aux antibiotiques.

- **Principe de fonctionnement**

Le mini API® permet deux types de lecture.

- **La lecture turbidimétrique et néphélémétrique**

Elle est destinée aux galeries turbinéphélémétriques.

Exemple : ID 32 GN ; ID 32 C ; ATB UR

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

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

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

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

- **1ère étape :**

Entrée du chariot porte galerie et détection du code de la galerie.

- **2ème étape :**

Mesure sous pression sans filtre puis sortie du chariot porte galerie. Lorsque le cycle de lecture est terminé, le logiciel traite les mesures effectuées.

➢ **La lecture colorimétrique**

Elle est destinée aux galeries colorimétriques.

Exemple **:** ID 32 STAPH ; ID 32 E ; Rapid ID 32 A ; Rapid ID 32 STREP

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

Le cycle d'une lecture colorimétrique s'effectue en 4 étapes :

- **1ère étape :**
  - 1ère entrée du chariot porte galerie
  - Détection du code de la galerie
  - Mesure sous filtre K60
- **2ème étape :**
  - 1ère sortie du chariot porte galerie
  - Mesure sous filtre K40
- **3ème étape :**
  - 2ère entrée du chariot porte galerie
  - Mesure sous filtre DT bleu
- **4ème étape :**
  - 2ère sortie du chariot porte galerie
  - Mesure sous filtre DT vert

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

4.5.2. Les antibiotiques testés :

Ils sont listés sur les fiches d'enquête qui ont permis le recueil de nos données et se retrouvent en annexe. (cf annexe n°2)

4.6. MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DE PUS PROVENANT DE PLAIES DIABETIQUES AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX

4.6.1. Principe

Il s'agit d'identifier les germes pathogènes responsables d'infections des plaies diabétiques par ensemencement sur un certains nombre de milieux de culture spécifiques aux germes recherchés et de réaliser un antibiogramme après confirmation de la nature du ou des germes responsables.

4.6.2. Matériels

- Microscope ;
- Bec benzène ;
- Micropipettes ;
- Pipettes Pasteur ;
- Jarre (aérobie et anaérobie) ;
- Plaque chauffante ;
- Etuve ;
- Automates (mini API® - VITEK® 2 Compact) ;
- Vortex ;
- Densitomètre ;
- Cassette VITEK® 2 Compact.

4.6.3. Consommables

- Gants ;
- Embouts ;

- Lames et lamelles ;
- Tubes à hémolyse ;
- Oeses ;
- Cartes VITEK® 2 Compact ;
- Disques pour antibiogramme ;
- Sachets anaérobies.

4.6.4. 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 ;

4.6.5. Pré analytique

La phase pré analytique est celle qui s'étend du prélèvement à l'arrivée de la substance prélevée sur la paillasse de bactériologie. Le prélèvement du pus de plaie diabétique est hospitalier. Le prélèvement arrivé au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux sera enregistré à l'accueil ; c'est-à-dire identifié par un numéro. Il sera de suite acheminé à la paillasse de bactériologie.

- **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 conservé au frais (4°C) pour le lendemain.

N.B : Ecouvillon et tube sont disponibles au Laboratoire Rodolphe Mérieux.

- **Localisation du prélèvement dans le système informatique**

L'édition de la fiche de paillasse sur le System CODAT Informatique se fait en tapant **66** après avoir saisi le nom et le mot de passe de l'utilisateur qui est individuel. On aura ainsi eu

accès au numéro d'identification du patient lequel est étiqueté sur le contenant du prélèvement plus tôt acheminé sur la paillasse de bactériologie. La fiche de paillasse consacrée peut être imprimée en suivant sur le système CODAT la démarche :

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 si c'est :

- Cutané	- Oreille droite	- Narine droite	- Plaie	- Cathéter
- Lait maternel	- Oreille gauche	- Narine gauche	- Ulcère	
- Squames	- Œil droit lingual	- Péri anal	- Sécrétion	
- Ongle	- Œil gauche	- Gingival	- Gland	
- Nasal	- Buccal	- Gorge	- Escarre	

Dans le cas où le prélèvement provient d'une plaie d'un patient diabétique, la mention « plaie diabétique » est posée sur la fiche de paillasse plus tôt récupérée.

L'origine du prélèvement sera précisée dans la liste **DC** : si le prélèvement est soit effectué au laboratoire, transmis ou apporté**.**

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

A la paillasse on dispose ainsi du prélèvement enregistré, la fiche d'examen envoyé par le médecin et la fiche de paillasse imprimée pour la circonstance. La concordance entre le numéro de l'échantillon à traiter et le numéro figurant sur la feuille de paillasse est aussitôt vérifiée et les fiches de demande d'examen et celle de paillasse sont agrafées. On procédera ensuite aux différents examens et ce dans un ordre précis. Les résultats de ces différents examens seront fidèlement inscrits sur notre fiche de laboratoire.

4.6.6. Phase Analytique de l'examen

Il s'agit de la phase technique de laboratoire de l'examen donc du traitement proprement dit de l'échantillon jusqu'à la conclusion de la présence ou non d'un ou des germes et de la réalisation des antibiogrammes au besoin.

▣ Préparation de la suspension

- Porter les milieux de culture (géloses au sang – Drygalski – Chapman- Sabouraud– CAN 2 – Mueller Hinton) à l'étuve pour séchage dix (10) minutes environ,
- Préparer si possible une suspension à l'aide de API Medium (si prélèvement par écouvillonnage),
- Identifier un tube à hémolyse contenant un bouillon de cœur-cervelle et y ajouter deux à trois gouttes de la suspension réalisée si la plaie est profonde.
- Si le prélèvement est dans un tube on n'a pas besoin de faire la suspension, utiliser directement le prélèvement.

▣ 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. (Mode opératoire de la coloration de Gram cf annexe n°3),

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

▣ Cultures

- Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu :
  - Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO_2 ;
  - Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO_2 ;
  - 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 citées ci-dessus avec un nombre élevé de leucocytes, penser à la recherche de BAAR.

▣ 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_2 pendant 48 heures,
- **Si Bacille Gram négatif** : lactose positive, faire l'identification et l'antibiogramme et lactose négative, faire le test à l'oxydase puis réaliser simultanément une identification et un antibiogramme en fonction du résultat du test. (mode opératoire du test à l'oxydase cf annexe n°4)
- **Si 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 pneumoniae* par le test d'optochine, (mode opératoire du test de catalase cf annexe n°5 ; mode opératoire du test à l'optochine cf annexe n°6).
- **Si Cocci Gram positif,** catalase positive, mannitol positif, faire la coagulase puis passer à l'antibiogramme en cas de positivité, (mode opératoire du test de coagulase cf annexe n°7)
- Si la coagulase est négative discuter avec le biologiste ou ses assistants et étudier toujours en fonction du contexte clinique.
- **Si présence des levures**, identifier et faire l'antibiogramme.
- Autre morphologie, à discuter avec le biologiste ou ses assistants.

Les procédures d'identifications et d'antibiogrammes sont systématiquement accompagnées d'une nouvelle culture sur gélose en fonction du germe suspecté. L'intérêt de cette nouvelle culture est d'avoir à disposition des souches bactériennes jeunes dans le cas où la bactérie serait multirésistante (bacilles multi résistants, staphylocoques méticilline résistants et vancomycine résistants…) pour réaliser le « souchage » ou si l'analyse devrait être reprise.

▣ Interprétation des antibiogrammes proprement dite

- Lorsqu'elle est réalisée à partir des disques sur milieu Mueller-Hinton (MH) ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant aux 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 de confirmer les résultats sur la sensibilité – intermédiaire et la résistance donnés par l'appareil.
- Si l'antibiogramme est réalisé sur le VITEK® 2 Compact, une éventuelle interprétation devient difficile en ce sens que tout se passe dans la machine. L'essentiel est de ne pas confondre les cartes AST Gram positif et négatif.
- Dans le cas d'une bactérie productrice de Bêta lactamase à spectre élargi : faire la recherche de BLSE sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : Amoxicilline + Acide clavulanique (AMC) au centre, cefotaxime (CTX) de côté et ceftazidime (CZ) de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.

Par l'une de ces mesures, on pourra apprécier au travers des résultats, la sensibilité, la résistance intermédiaire et la résistance proprement dite de la bactérie concernée en fonction des antibiotiques testés.

Et lorsque la multirésistance d'une souche bactérienne aura été confirmée, on procèdera à un « souchage » de la souche bactérienne en question.

▣ Souchage

Il s'effectue à partir de souches bactériennes pures dont la pureté est effectuée sur un milieu propice à la croissance de la bactérie concernée.

Il consiste en la conservation de bactéries déclarées multi résistantes à des températures indiquées empêchant toute multiplication bactérienne.

(Mode opératoire du souchage des bactéries cf annexe n°8)

▣ Validation technique / Critères de repasse

Elle est réservée au Technicien qui apprécie la pureté de ces 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 antibiogramme.

4.6.7. Phase post analytique

▣ Validation Biologique

Réservée 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.

▣ Rendu de résultat

Préalablement noté sur la fiche de paillasse éditée sur le système informatique CODAT, toutes les informations recueillies lors de la phase analytique ainsi que les résultats à titre de nom du ou des germe(s) identifié(s) comme étant en cause ainsi que les résultats de l'antibiogramme réalisé sont saisis dans les résultats définitifs des examens de pus de plaies diabétiques effectués au Laboratoire Rodolphe Mérieux.

Si possible le résultat peut être communiqué par téléphone au clinicien en charge du patient. Cependant seul le biologiste est en mesure de téléphoner ou ses assistants.

4.6.8. Gestions des déchets

Les boîtes de pétri utilisées datant de deux jours sont vidées à chaque fin de journée dans les sachets poubelle qui doivent être bien scotchés et déportés à l'arrière du laboratoire dans les grands fûts appropriés qui y sont déposés pour la circonstance.

4.6.9. Archives

La fiche de demande d'examen photocopiée, la fiche de paillasse portant toutes les mentions de l'examen et les fiches relatant les résultats de l'antibiogramme constituent le dossier final de chaque prélèvement de pus provenant de plaie diabétique analysé au Laboratoire Rodolphe Mérieux. Ces dossiers en fin d'étude sont mis dans un carton portant mention de la période d'usage. Ce carton une fois rempli est transféré au magasin où une étagère est prévue pour les archives.

4.6.10. Hygiène et sécurité

- Avant et après les manipulations à la paillasse de bactériologie, nettoyer la paillasse avec de l'eau de javel ;
- Toujours manipuler en présence d'une flamme à défaut d'une hotte ;
- Toujours porter des gants, des chaussures fermées et si possible un masque de protection ;

- Eviter de toucher les portes, les appareils et les microscopes avec les gants ;
- Ne jamais manger ni boire lors des manipulations en laboratoire.

4.6.11. Evaluation des risques

- 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 javel et au savon bactéricide.

4.7. ASPECTS BIOETHIQUES

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

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

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

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

4.8. COLLECTE DES DONNEES

Elle a consisté à l'analyse des fiches de paillasse dédiées aux prélèvements de pus provenant de plaies diabétiques. Les fiches d'enquêtes étaient apprêtées et les informations concernant l'aspect épidémiologique des patients, la nature des germes, et le résultat de l'antibiogramme réalisé y ont été portés.

4.9. ANALYSE ET TRAITEMENT INFORMATIQUE DES DONNEES

Nos données ont été saisies à l'aide du logiciel Word 2007, analysées à l'aide du logiciel IBM SPSS 19.0 et nos figures réalisées à l'aide du logiciel Excel 2007.

5. RESULTATS

RESULTATS

5.1. RESULTATS GLOBAUX

Au LRM, 305 analyses de pus ont été réalisées au cours de notre période d'étude dont 58 concernant les patients diabétiques soit une fréquence de 19,1%. La moyenne mensuelle des examens de pus non diabétiques était cinq fois supérieure à celle des pus diabétiques analysés. Ces prélèvements de pus diabétiques dont l'essentiel (84,5%) a été réalisé au Centre National de Lutte contre le Diabète (CNLD) étaient pratiquement tous positifs à la culture soit 49 échantillons ; 84,5% des pus diabétiques analysés.

5.1.1. Prélèvements de pus au LRM de janvier à décembre 2013

Tableau II : Distribution des prélèvements de pus analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon la nature.

	Effectifs	Pourcentage
Pus diabétique	58	19,1
Pus non diabétiques	247	80,9
Total	**305**	**100**

19,1% des pus analysés au LRM provenaient de patients diabétiques.

La moyenne mensuelle des examens de pus non diabétiques était cinq fois supérieure à celle des pus diabétiques analysés.

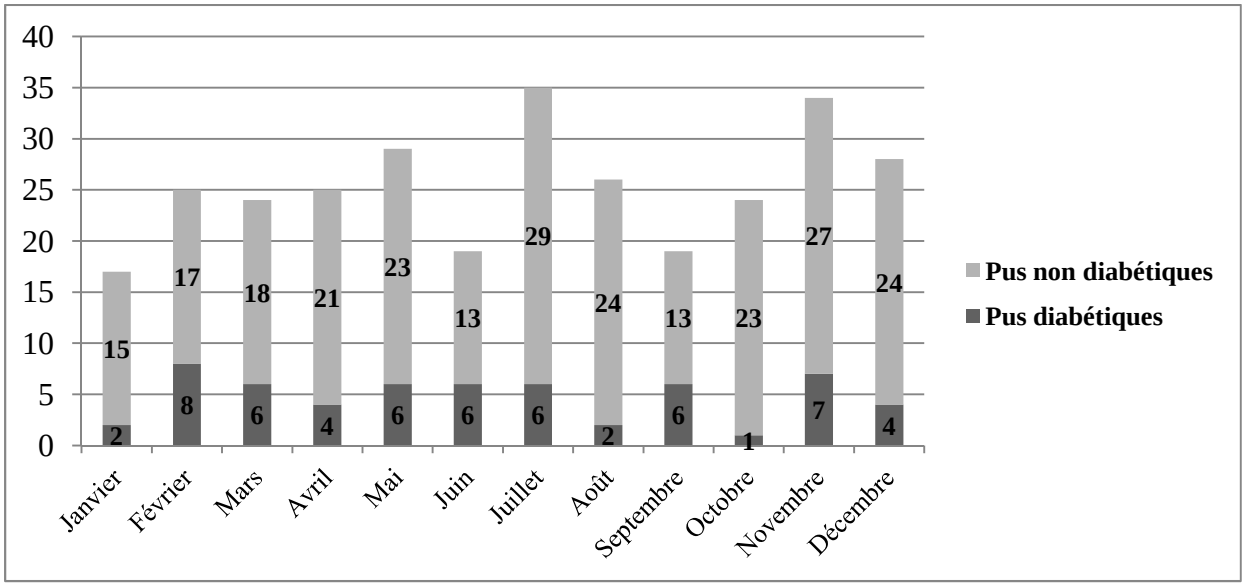


Figure 5 : Distribution mensuelle des demandes d'analyses de pus au LRM

Tableau III : Répartition des prélèvements de pus désignés « non diabétiques » selon l'organe atteint

Pus non diabétiques	Culture positive (n)	Culture négative(n)	Total (n)
Sans précision	45	18	63
Plaie chronique	19	11	30
Pus d'oreille	37	31	68
Pus de gorge	1	8	9
Pus buccal	-	2	2
Abcès du cou	2	1	3
Abcès du crâne	1	-	1
Abcès de la cuisse	2	-	2
Adénopathie suppurante	-	4	4
Ascite	2	1	3
Empyème cérébrale opérée	-	1	1
Epanchement péricardique	-	1	1
Infections post- opératoires	7	-	7
Lésions tumorales de l'aisselle	1	-	1
Liquide articulaire	2	-	2
Liquide pleural	3	4	7
Liquide prostatique	-	1	1
Onyxis	1	6	7
Ostéite	7	10	17
Perte urétrale	-	1	1
Polyarthrite fébrile	1	-	1
Sécrétions bronchiques	1	-	1
Seins	1	3	4
Sinusite	1	2	3
Suppurations pariétales	5	2	7
Tumeur ulcérée de la langue	1	-	1
Total	**140**	**107**	**247**

n : Effectifs

Les pus non diabétiques avaient une diversité de sites d'atteintes.

5.1.2. Origine des prélèvements

L'essentiel de nos prélèvements provenait du CNLD. En effet, 49 (84,5%) prélèvements provenaient du CNLD contre 9 (15,5%) prélèvements réalisés dans les hôpitaux.

5.1.3. Résultats à la culture

Les pus diabétiques analysés au LRM étaient à 84,5% (49 prélèvements) positifs à la culture et nécessitaient donc un antibiogramme contre 15,5% (9 prélèvements) dont la culture était négative.

5.1.4. Relation entre origines des prélèvements et résultats à la culture

Des 49 prélèvements de pus diabétiques positifs à la culture, 41 provenaient du CNLD et 8 étaient d'origine hospitalière. Des 9 prélèvements dont la culture était négative, 8 provenaient de CNLD et un était d'origine hospitalière.

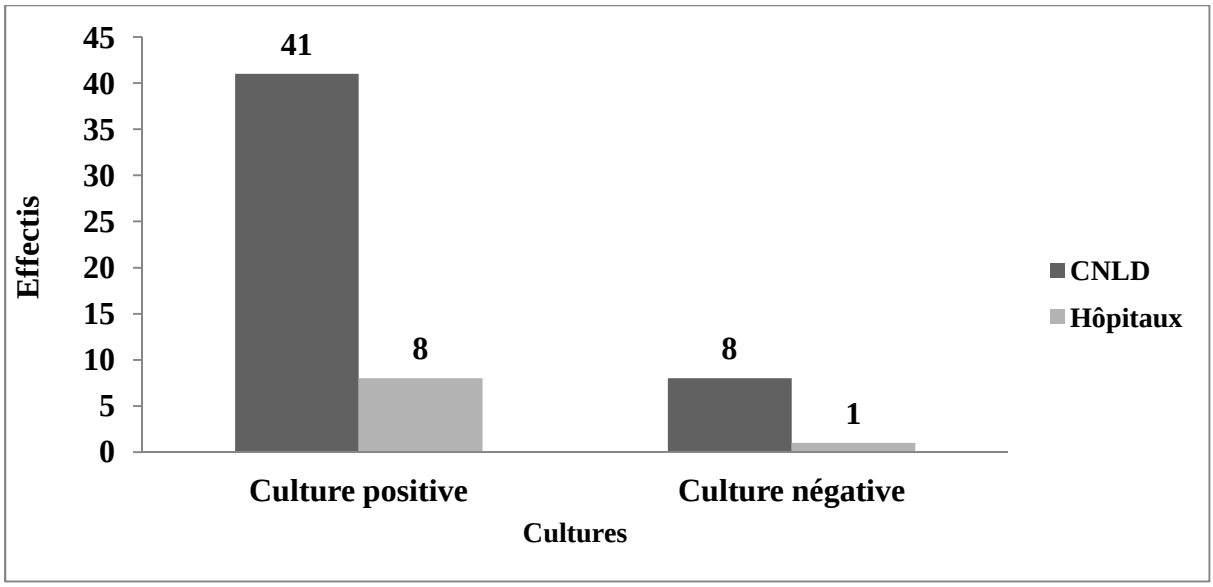


Figure 6 : Relation entre origines des prélèvements et résultats à la culture des prélèvements de pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013.

5.1.5. Sexe des patients présentant des prélèvements de pus diabétiques infectés analysés au LRM de janvier à décembre 2013

Le sexe- ratio de notre échantillon de patients diabétiques dont les prélèvements étaient infectés et ont donc nécessité un antibiogramme était de 1,6 en faveur des hommes. On retrouve donc une prédominance masculine 30 (61,2%) pour 19 (38,8%) femmes.

5.1.6. Age des patients diabétiques présentant un prélèvement infectieux

La tranche d'âge 40 à 59ans était représentée à 42,9%, suivie de la tranche 20 à 39ans à 34,7% et 22,4% pour les patients âgés de 60 ans et plus. La moyenne d'âge était 48,1 ans et l'écart-type16,5 ans.

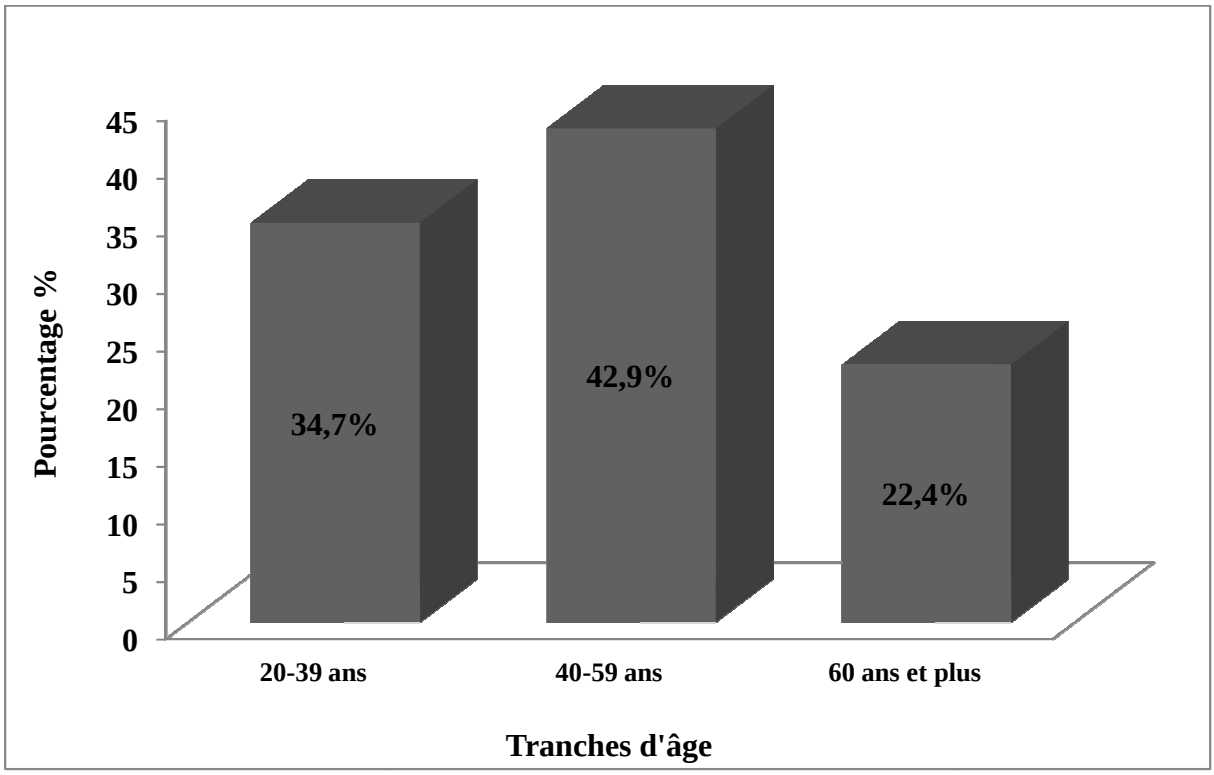


Figure 7 : Répartition des patients diabétiques présentant des pus infectés analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'âge

5.1.7. Souches bactériennes isolées

Tableau IV : Répartition des souches bactériennes isolées des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'espèce

Germes isolés	Effectifs	Pourcentage
Staphylococcus aureus	**18**	**26,1**
Escherichia coli	**18**	**26,1**
Proteus mirabilis group	**10**	**14,5**
Proteus vulgaris group	4	5,8
Klebsiella pneumoniae ssp pneumonie	3	4,6
Streptococcus agalactiae	3	4,6
Enterobacter cloacae complex	2	2,9
Acinetobacter baumannii complex	1	1,4
Burkholderia cepacia group	1	1,4
Burkholderia pseudomallei	1	1,4
Edwardsiella tarda	1	1,4
Enterobacter aerogenes	1	1,4
Enterococcus faecium	1	1,4
Erysipelothrix rhusiopathiae	1	1,4
Morganella morganii ssp morganii	1	1,4
Pseudomonas aeruginosa	1	1,4
Staphylococcus intermedius	1	1,4
Staphylococcus xylosus	1	1,4
Total (18)	**69**	**100**

Les 49 échantillons positifs ont permis d'isoler 69 germes répartis en 18 germes différents avec une fréquence élevée de trois (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ; *Proteus mirabilis*) soit 66,7% de l'ensemble des germes.

Les 69 germes isolés ont permis de définir des prélèvements mono et polymicrobiens. Ainsi, parmi les pus diabétiques positifs à la culture, 63,3% étaient monomicrobiens alors que 36,7% étaient polymicrobiens. Parmi ces derniers, il y avait 34,7% de bimicrobiens et 2% de trimicrobiens.

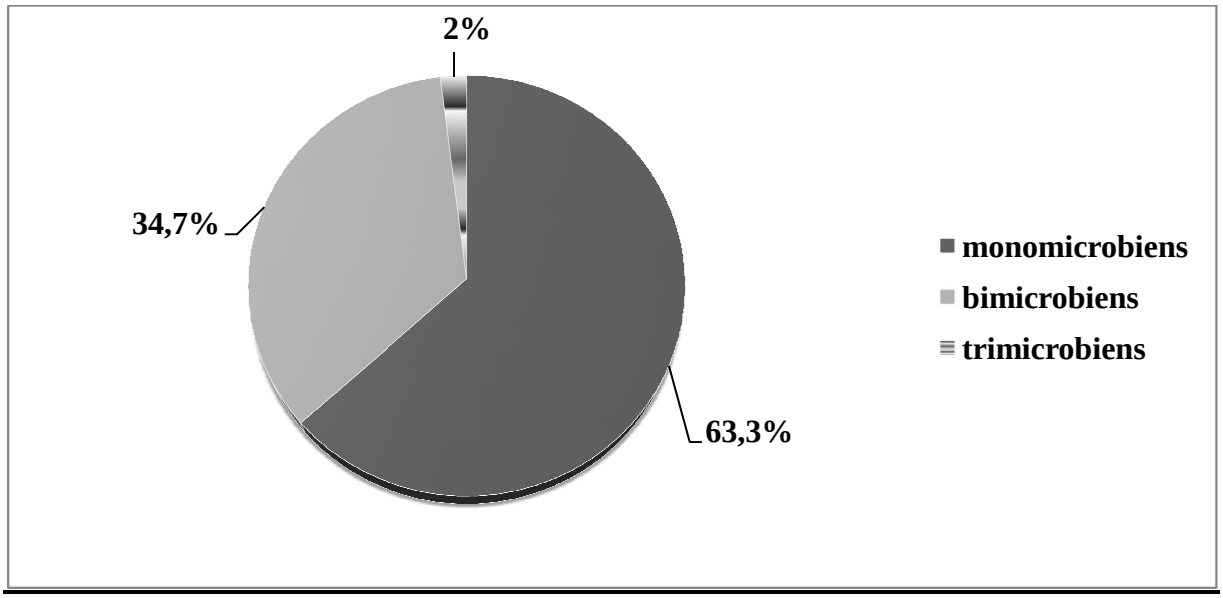


Figure 8 : Répartition des prélèvements de pus diabétiques positifs à la culture et analysés au LRM de janvier à décembre 2013 selon le nombre de germes identifiés.

Tableau V : Fréquence d'associations des germes isolés des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013

Germes associés		Effectifs	Pourcentage
E. coli (11) +	*S. xylosus*	1	5,6
	S. aureus	4	22,4
	K. pneumoniae	1	5,6
	Morganella morganii spp morganii	1	5,6
	S. agalactiae	1	5,6
	Proteus vulgaris group	1	5,6
	Proteus mirabilis group	1	5,6
	S.aureus + K.pneumoniae	1	5,6
S.aureus +	*Proteus mirabilis*	3	16
	Enterobacter aerogenes	1	5,6
	E. cloacae complex	1	5,6
	Yersinia enterolitica group	1	5,6
P. aeruginosa +	*S.intermedius*	1	5,6
Total		**18**	**100,0**

E. coli est la bactérie la plus impliquée dans les associations de germes. L'association la plus observée était celle de *E. coli* et *S. aureus* 22,4%, suivie de celle de *S. aureus* et *P. mirabilis* 16%. Les autres associations observées étaient de l'ordre de 5,6% chacune.

5.1.8. Antibiogramme

Les antibiogrammes ont été réalisés à hauteur de 95,7% (63) à l'aide de l'automate VITEK®2 Compact et à 4,3%(6) l'aide du mini API®.

5.2. RESULTATS SUR LA RESISTANCE BACTERIENNE

Tableau VI : Niveau de résistance aux antibiotiques testés de *Staphylococcus aureus* isolées des pus diabétiques analysés au LRM de janvier à décembre 2013.

Antibiotiques testés	Sensible (n)	Résistante (n(%))	Total (n)
Flomoxef	-	11(61,1)	11
Benzylpenicilline	2	15 (83,3)	17
Cloxacilline	7	9 (50,0)	16
Flucloxacilline	7	9 (50,0)	16
Méticilline	7	9 (50,0)	16
Oxacilline	8	9 (50,0)	17
Cefaclor	7	9 (50,0)	16
Cephapirine	7	9 (50,0)	16
Ceftibutène	7	9 (50,0)	16
Ceftizoxime	7	9 (50,0)	16
Ceftriaxone	7	9 (50,0)	16
Doripenem	7	9 (50,0)	16
Faropenem	7	9 (50,0)	1
Imipénème	7	10 (55,6)	1
Gentamicine	16	1 (5,6)	1
Tobramycine	16	1 (5,6)	1
Eurofloxacine	-	1 (5,6)	1
Levofloxacine	5	13 (72,2)	18
Moxifloxacine	12	6 (33,3)	18
Dirithromycine	7	9 (50,0)	16
Erythromycine	7	11(61,1)	18
Clindamycine	10	8 (44,4)	18
Lincomycine	2	7 (38,9)	9
Linézolide	14	4 (22,2)	18
Téicoplanine	14	4 (22,2)	18
Vancomycine	17	1 (5,6)	18
Doxycycline	4	11 (61,1)	14
Tétracycline	4	14 (77,8)	18
Tigecycline	18	- (-)	18
Fosfomycine	17	- (-)	17
Nitrofurantoïne	18	- (-)	18
Acide fusidique	14	3 (16,7)	17
Mupirocine	17	- (-)	17
Rifampicine	-	16 (88,9)	16
Cotrimoxazole	12	6 (33,3)	18

n : Effectifs % : Pourcentage

Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés contre la rifampicine 88,9% suivis du benzylpenicilline 83,3%, tétracycline 77,8%. Les niveaux de résistance les plus faibles ont été observés contre la gentamycine, la tobramycine et l'eurofloxacine 5,6%. Des niveaux de résistance nuls ont été observés contre la tigecycline, la fosfomycine, la nitrofurantoïne et le

cotrimoxazole. Les autres antibiotiques présentaient un niveau de résistance compris entre 16,7 et 61,1%.

Tableau VII : Niveau de résistance aux antibiotiques testés des *Escherichia coli* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013.

Antibiotiques testés	Sensible (n)	Résistante (n(%))	Total (n)
Ampicilline	1	17 (94,4)	18
Amoxicilline + Acide clavulanique	5	13 (72,2)	18
Ticarcilline	-	18 (100,0)	18
Pipéracilline+ Tazobactam	11	7 (38,9)	18
Cefalotine	1	17 (94,4)	18
Cefoxitine	15	3 (16,7)	18
Cefotaxime	5	13 (72,2)	18
Ceftazidime	6	12 (66,6)	18
Ertapénème	18	- (-)	18
Imipénème	18	- (-)	18
Amikacine	14	4 (22,2)	18
Gentamicine	7	11 (61,1)	18
Tobramycine	5	13 (72,2)	18
Acide nalidixique	1	17 (94,4)	18
Ciprofloxacine	1	17 (94,4)	18
Ofloxacine	1	17 (94,4)	18
Nitrofurantoïne	15	3 (16,7)	18
Cotrimoxazole	2	16 (88,9)	18

n : Effectifs % : Pourcentage

Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés contre la ticarcilline (100%) suivis de l'ampicilline, du cefalotine, de l'acide nalidixique et de l'ofloxacine (94,4%). Les niveaux de résistance les plus faibles ont été observés contre la cefoxitine et le nitrofurantoïne (16,7%) ainsi qu'à l'ertapénème et à l'imipénème des antibiotiques pour lesquels aucune résistance n'a été observée. Les autres antibiotiques présentaient un niveau de résistance compris entre 22,2 et 72,2%.

Tableau VIII : Niveau de résistance aux antibiotiques testés des *Proteus mirabilis* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013.

Antibiotiques testés	Sensible (n)	Résistante (n (%))	Total (n)
Ampicilline	2	8 (80)	10
Amoxicilline + Acide clavulanique	7	3 (30)	10
Ticarcilline	-	10 (100)	10
Pipéracilline+ Tazobactam	9	1 (10)	10
Cefalotine	7	3 (30)	10
Cefoxitine	1	9 (90)	10
Cefotaxime	5	5 (50)	10
Ceftazidime	3	7 (70)	10
Ertapénème	2	8 (80)	10
Amikacine	9	1 (10)	10
Gentamicine	6	4 (40)	10
Tobramycine	6	4 (40)	10
Acide nalidixique	5	5 (50)	10
Ciprofloxacine	6	4 (40)	10
Ofloxacine	5	5 (50)	10
Cotrimoxazole	2	8 (80)	10

n : Effectifs % : Pourcentage

Les niveaux de résistance les plus élevés ont été observés contre la ticarcilline (100%) suivis de la cefoxitine (90%), de l'ampicilline et du cotrimoxazole (80%), et du ceftazidime (70%). Les niveaux de résistance les plus faibles ont été observés contre l'association pipéracilline + tazobactam et l'amikacine (10%). Les autres antibiotiques présentaient un niveau de résistance intermédiaire compris entre 30 et 50%.

Tableau IX : Niveau de résistance aux antibiotiques testés de *Pseudomonas aeruginosa* isolée de pus diabétique au LRM de janvier à décembre 2013

Une seule souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée et sa sensibilité se présentait comme suit

	Antibiotiques
Sensible	Méropénème
	Imipénème
	Amikacine
	Tobramycine
	Ciprofloxacine
	Colistine
Résistante	Ticarcilline+ Acide clavulanique
	Pipéracilline
	Pipéracilline + Tazobactam
	Ceftazidime
	Céfépime

5.3. MULTIRESISTANCE BACTERIENNE

La résistance à la méticilline a été observée chez 50% des souches de *Staphylococcus aureus* isolées ; 50% des souches de *Staphylococcus aureus* ne présentaient pas de résistance à la méticilline.

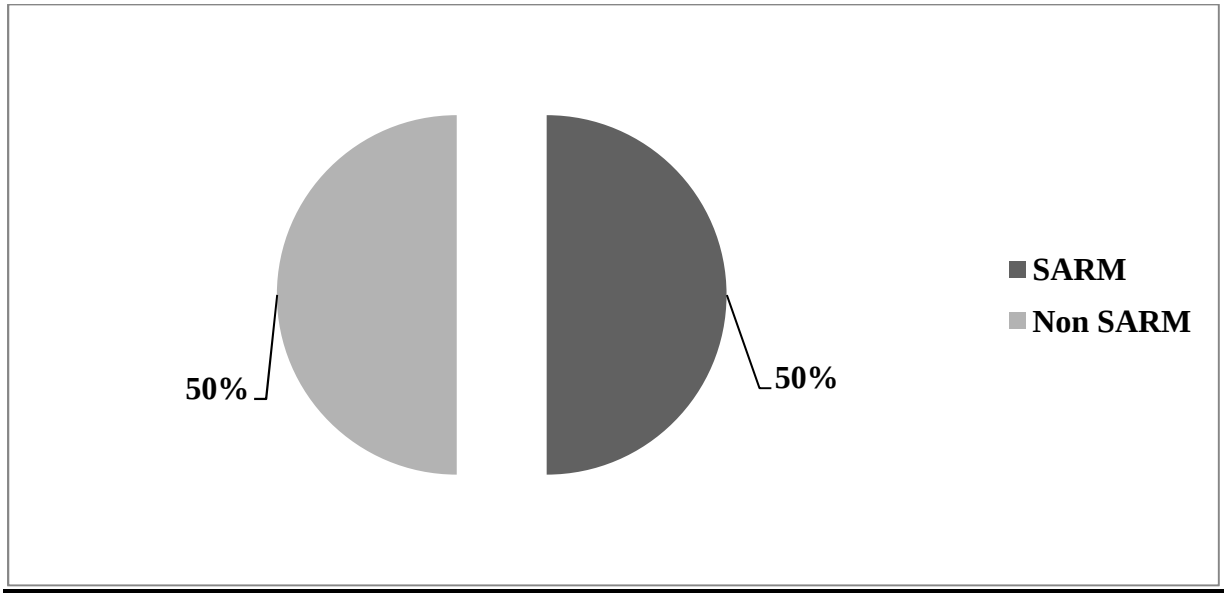


Figure 9 : Répartition des *Staphylococcus aureus* isolées de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur résistance à la méticilline

5,5% des souches de *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la vancomycine ; 94,5% des souches ne l'étaient pas

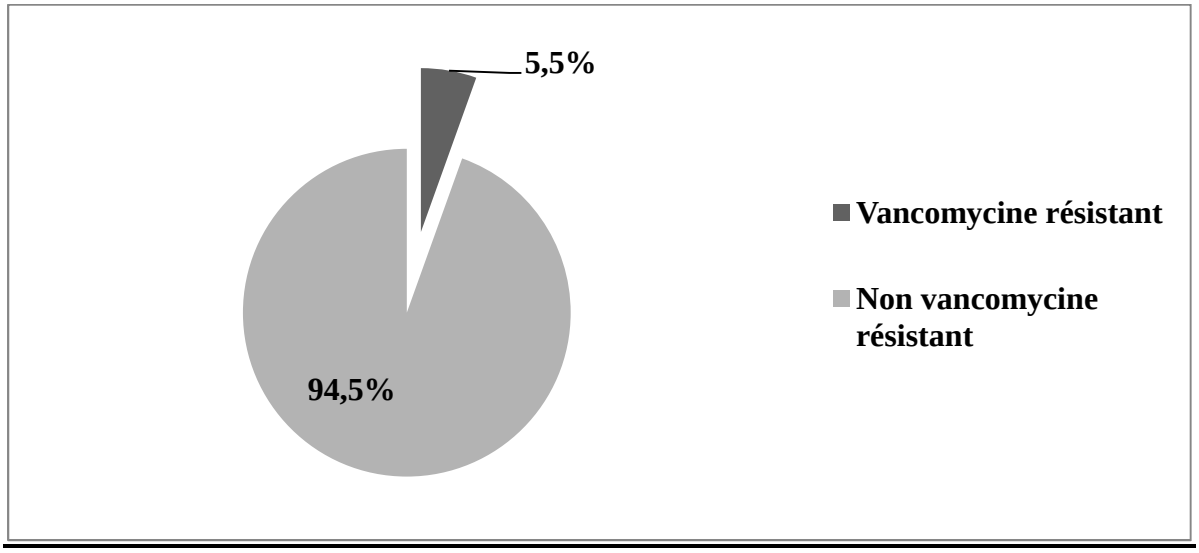


Figure 10 : Répartition des *Staphylococcus aureus* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur résistance à la vancomycine

Tableau X : Répartition des germes isolés de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leur capacité à produire des BLSE

	Effectifs	Pourcentage
BLSE	14	20,3
Non BLSE	54	79,7
Total	**69**	**100**

Des 69 germes isolés, 14 étaient producteurs de BLSE soit 20,3% de l'ensemble des germes contre 54 soit 79,7% de l'ensemble des germes isolés qui ne produisaient pas de BLSE.

Parmi les bactéries productrices BLSE, *Escherichia coli* représentaient 64,3% de l'effectif suivies de *Klebsiella pneumoniae* 14,4%.Trois autres espèces (*Proteus mirabilis, Proteus vulgaris group* et *Enterobacter cloacae complex*) complétaient cette liste avec chacune 7,1%

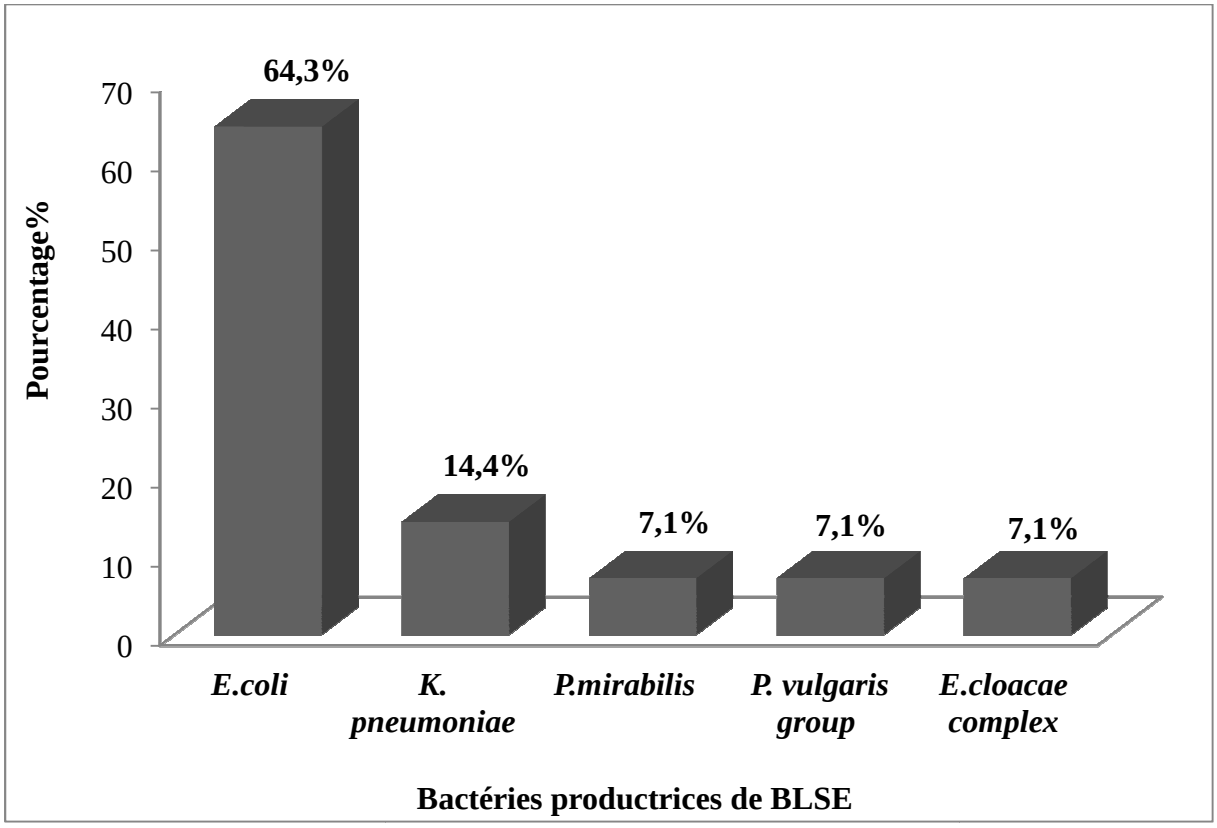


Figure 11 : Répartition des bactéries productrices de BLSE isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon leurs espèces

Tableau XI : Proportion de germes producteurs de BLSE au sein des souches bactériennes productrices isolées au LRM de janvier à décembre 2013

Germes producteurs de BLSE	BLSE (n(%))	Total (n)
E. coli	9 (50)	18
K. pneumoniae	2 (66,7)	3
P. mirabilis	1 (10)	10
P. vulgaris group	1 (25)	4
E. cloacae complex	1 (50)	2
Total	**14**	**37**

n : Effectifs ; % : Pourcentage

Parmi les 14 germes isolés producteurs de BLSE, 66,7% des *K. pneumoniae*, 50% des *E. coli*, 50% des *E. cloacae complex*, 25% de *P. vulgaris group* et 10% des *P. mirabilis* étaient retrouvés.

Tableau XII : Distribution générale des souches bactériennes isolées de pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon qu'elles soient multi résistantes (BMR) ou non

	Effectifs	Pourcentage
BMR	24	34,8
Non BMR	45	65,2
Total	**69**	**100**

Au total des 69 souches bactériennes isolées, 24 étaient multirésistantes soit 34,8% des germes contre 45 souches bactériennes soit 65,2% qui n'étaient pas multirésistantes.

Parmi les souches bactériennes désignées multirésistantes *S. aureus* était la plus représentée à hauteur de 37,6% suivie de *E. coli* 29,3%. *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* et *P. vulgaris group* étaient chacune représentée à 8,3%. Les plus faibles représentations dans cette liste ont été observées chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia group* chacune représentant 4,1% de l'ensemble des bactéries multirésistantes isolées.

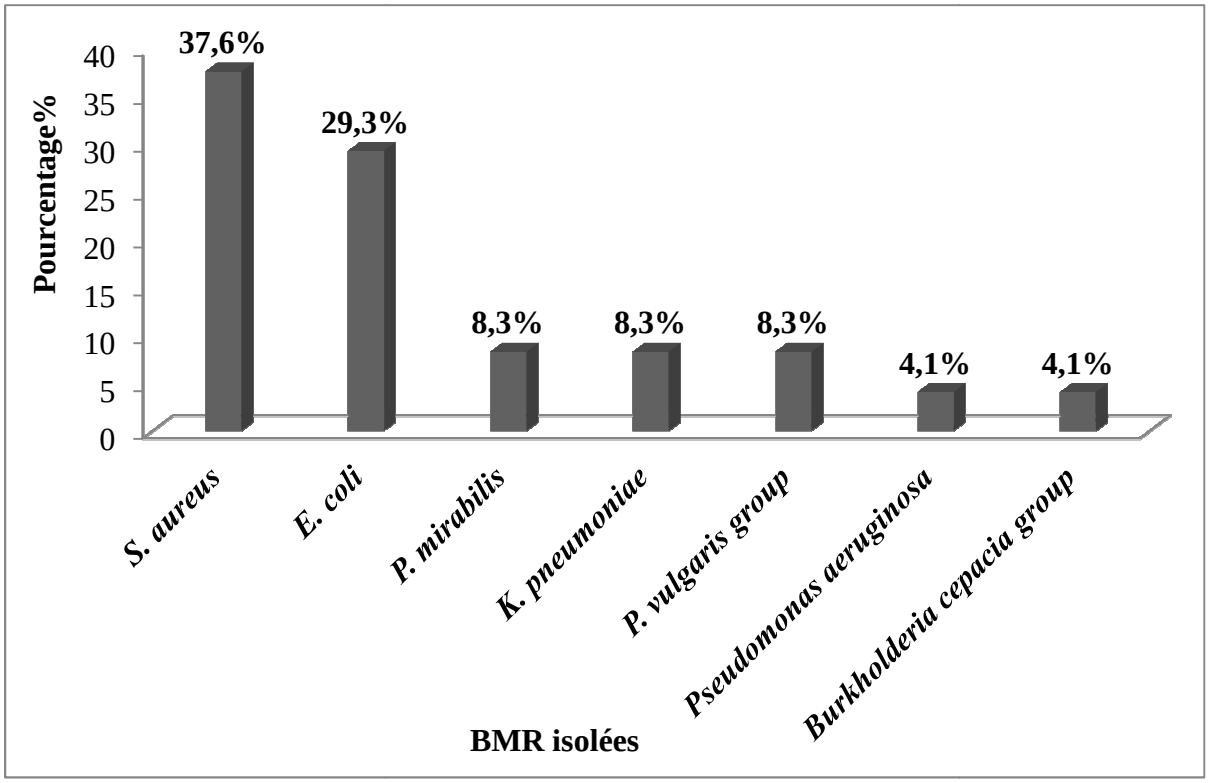


Figure 12 : Distribution des BMR isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013 selon l'espèce

Tableau XIII : Proportion de multi résistance au sein des espèces bactériennes multirésistantes isolées au LRM de janvier à décembre 2013

	BMR (n(%))	Total
S. aureus	9 (50)	18
E. coli	7 (38,9)	18
P. mirabilis	2 (20)	10
K. pneumoniae	2 (66,7)	3
P. vulgaris group	2 (50)	4
P. aeruginosa	1 (100)	1
Burkholderia cepacia group	1 (100)	1
Total	**24**	**55**

n : Effectifs ; % : Pourcentage

Les germes *P. aeruginosa* et *Burkholderia cepacia group* étaient multi résistants contre 66,7% des *K. pneumoniae*, 50% des *S. aureus*, 38,9% des *E. coli* et 20% des *P. mirabilis* isolés qui étaient multi résistants.

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Notre étude qui s'est déroulée au Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM) du 1er janvier 2013 au 31 décembre 2013 était une étude transversale, prospective et descriptive. Elle a concerné 58 prélèvements de pus diabétiques soit 19,1% de l'ensemble des pus analysés au LRM. A la culture, 49 de ces prélèvements étaient positifs (84,5% des pus diabétiques), justifiant la réalisation d'antibiogrammes. Ces derniers répondaient donc à nos critères d'inclusion.

6.1. NATURE DES PRELEVEMENTS DE PUS ANALYSES AU LRM

Notre laboratoire traite en moyenne 4,8 prélèvements issus de plaies diabétiques par mois. Un chiffre qui représente approximativement le cinquième de tous les prélèvements de pus analysés au LRM. C'est dire la part importante de la population diabétique fréquentant notre structure et aussi le nombre des complications de pied diabétique très significatif. Ce chiffre qui n'est donc pas à négliger cache aussi une vérité. Celle selon laquelle tous nos prélèvements analysés sont positifs dans leur grande majorité à la culture. Notre étude a montré une positivité à hauteur de 84,5% des prélèvements de pus diabétiques analysés. Le sens diagnostic des prescripteurs d'analyses est ici à saluer. Les « pus non diabétiques » ; appellation désignant les prélèvements issus de patients non diabétiques étaient d'origine diverses (pus d'oreille,…).

6.2. ORIGINE ET RESULTATS A LA CULTURE DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES ANALYSES AU LRM

L'ensemble de nos prélèvements analysés a été acheminé au LRM après des prélèvements faits au niveau de structures sanitaires. En effet, 84,5% de ces prélèvements provenaient du Centre National de Lutte contre le Diabète, un centre spécialisé dans la prise en charge du diabète et de ses complications au Mali. L'origine de la majorité de nos prélèvements de pus diabétiques nous rassure donc car contribuant à une fiabilité de nos résultats ; la qualité de l'acte de prélèvement impactant largement sur ces derniers. Cependant si 84,5% de nos prélèvements provenaient du CNLD et que 84,5% des prélèvements diabétiques étaient positifs à la culture cela ne voudrait pas dire que tous les prélèvements faits au CNLD étaient positifs. En effet, seulement 41 prélèvements faits au CNLD sur les 49 réalisés soit 83,7% étaient positifs.

6.3. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES INFECTES

Dans notre étude le sexe ratio a été de 1,6 en faveur des hommes ce qui est en faveur des données de la littérature lesquelles estiment que les hommes sont en général plus exposés aux ulcères du pied et aux amputations **[40]**.

La tranche d'âge 40 à 59 ans était la plus représentée soit 42,9% de notre population d'étude. Que cette tranche d'âge 40 à 59 ans soit la plus touchée par des infections de plaies diabétiques n'est pas étonnant vu que dans les pays en développement, la plupart des diabétiques sont âgés de 45 à 64 ans ; ce qui n'est pas le cas dans les pays développés où la majorité des diabétiques a plus de 65 ans **[41]**.

6.4. SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES INFECTES

Sur les 18 types différents de germes isolés des cultures, on note une prédominance de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* qui représentaient à eux trois 66,7% des germes. Ce résultat est similaire à celui trouvé par **Niangaly O. [42]** qui rapportait une prédominance à hauteur de 67,4% de ces mêmes germes pour une étude faite sur la population générale. C'est dire l'exactitude des données de la littérature qui prédisait un tel résultat pour des prélèvements de cette nature.

Nos prélèvements comportent des prélèvements monomicrobiens, mais notre étude confirme aussi la nature fréquemment polymicrobienne des pus diabétiques relatée dans la littérature. Nous avons remarqué l'association de deux germes au niveau de 34,7% des prélèvements et de trois germes dans 2 % des prélèvements.

Escherichia coli était le germe plus impliqué dans les associations de germes soit 61,6% des associations de germes suivi de *Staphylococcus aureus* 32,8% et de *Pseudomonas aeruginosa* à 5,6%. Une association remarquable de trois germes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) a également été répertoriée. **Niangaly O. [42]** a trouvé dans son étude comme fréquence d'association la plus élevée l'association avec *Staphylococcus aureus* à hauteur de 46,67%. Les associations de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgarius* et *Aeromonas salmonicida* ont également été citées dans

son étude avec respectivement comme fréquence d'association 21,42%, 14,28% et 7,14% pour chacune des deux dernières bactéries énumérées.

6.5. ANTIBIOGRAMME ET NIVEAU DE RESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PRELEVEMENTS DE PUS DIABETIQUES AU LRM DE JANVIER A DECEMBRE 2013

Des 58 prélèvements étudiés dont 49 cultures se sont révélées positives, 69 germes ont été clairement identifiés et ainsi fait l'objet d'un antibiogramme selon les méthodes utilisées au LRM. Ainsi 95,7% des antibiogrammes ont été réalisés à l'aide de l'automate VITEK® 2 Compact et 4,3% à l'aide du mini API®. Ces automates ont permis d'établir pour notre étude les niveaux de résistance analogues aux données disponibles de la littérature.

6.5.1. Niveau de résistance aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013

Dix-huit *Staphylococcus aureus* ont été isolés soit 26,1% de l'ensemble des germes isolés. Comme toutes les bactéries Gram positif, *Staphylococcus aureus* garde une résistance naturelle à l'aztréonam, à la colistine et à l'acide nalidixique mais pas aux bêtalactamines. Ainsi nous avons pu remarquer que 50% des *Staphylococcus aureus* de notre étude présentaient une résistance aux bêtalactamines notamment aux pénicillines (cloxacilline, flucloxacilline et oxacilline) et aux céphalosporines (cefaclor, cephapirine, ceftibutène, ceftizoxime,et ceftriaxone). **Niangaly O. [42]** avait quant à lui obtenu 88,9% de résistance à la pénicilline ; 75,2% de résistance à l'oxacilline sommes toutes des chiffres plus élevés que les nôtres. Les souches de *Staphylococcus aureus* provenant de patients diabétiques seraient-elles donc un peu plus à l'abri de la résistance aux bêtalactamines ?

La résistance à la méticilline, problème majeur de santé publique qui définit des staphylocoques ayant acquis le gène *mec* induisant la synthèse d'une enzyme (PBP2a ou PBP2') responsable d'une affinité très faible pour les β-lactamines, soit une action inhibitrice de ces derniers a été fréquemment observée. La plupart de ces staphylocoques selon la littérature sont également résistants aux quinolones et aux macrolides. La résistance à la méticilline qui condamne à une résistance à tous les bêtalactamines fut donc remarquée à hauteur de 50% définissant l'appellation *Staphylococcus aureus* méticillino- résistants (SARM).

En tenant compte des données de la littérature qui énonce la particularité de *Staphylococcus aureus* à avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines, seuls les autres antibiotiques du groupe ont été testés. Ainsi les souches de *Staphylococcus aureus* ont présenté un pourcentage de résistance de 50% au cefaclor, au cephapirine, au ceftibutène, au ceftizoxime et la ceftriaxone.

Ce fut également une résistance de l'ordre de 50% au niveau des pénèmes (doripenem, faropenem) avec un pourcentage plus élevé à l'imipénème soit 55,6%.

Les aminosides qui ne présentent pas d'intérêt chez le patient diabétique à cause des effets secondaires induits ont présenté un résultat acceptable à l'antibiogramme. En effet, ils agissent sur 88,9% des *Staphylococcus aureus* que nous avons isolé. Un niveau d'efficacité à donc préserver pour la population générale et qui dénote encore une fois les freins de la prise en charge des atteintes du pied diabétique. Ce résultat est corroboré par les études de **Niangaly O. [42]** faites sur la population générale qui ont rapporté une efficacité de 74,1% pour la kanamycine et la dibékacine et 88% pour la gentamicine sur les souches de *Staphylococcus aureus*.

Si notre étude a montré une résistance aux quinolones de 72,2% pour le levofloxacine et 33,3% pour la moxifloxacine sur les souches de *Staphylococcus aureus*, **Niangaly O. [42]** avait préalablement trouvé une efficacité de 91,6% pour la ciprofloxacine ceci concernant la population générale.

La résistance aux macrolides était également bien élevée soit 50% au dirithromycine et 61,1% à l'Erythromycine ce qui révèle encore une fois une trop grande élevation des résistances dans la population diabétique ; **Niangaly O**. **[42]** ayant retrouvé encore une fois une activité affichée de l'Erythromycine sur les souches de *Staphylococcus aureus* à hauteur de 73,3% dans la population générale.

Ces résistances élevées aux quinolones et macrolides étaient tout de même prévisibles au regard de la proportion de SARM obtenue.

La résistance à la clindamycine et la lincomycine était plus diminuée avec respectivement 44,4% et 38,9% que les chiffres précédemment retrouvés.

Le niveau de résistance au linézolide - qui fait partie des oxazolidinones la toute dernière classe d'antibiotiques découverte il y a 30 ans – était de 22,2% dans notre étude ; un résultat qui décrit l'ampleur du phénomène de résistance.

Les glycopeptides notamment la téicoplanine et la vancomycine ont montré également à l'antibiogramme respectivement des résistantes à hauteur de 22,2% et 5,6%. Les données de la littérature qui affichaient comme valeur sûre la vancomycine dans la prise en charge des infections à *Staphylococcus aureus* devraient être revues pour le patient diabétique.

La résistance aux cyclines était aussi bien élevée soit 61,1% pour la doxycycline et 77,8% pour la tétracycline. La tigecycline par contre a rencontré une résistance nulle soit une sensibilité de 100% aux souches de *Staphylococcus aureus* isolées.

Cette résistance nulle à la tigecycline fut également remarquée pour la nitrofurantoïne et à la fosfomycine. Le niveau de résistance à l'acide fusidique était de 16,7%.

Le cotrimoxazole s'est révélé à 33,3% non actif sur nos souches de *Staphylococcus aureus*. Nos résultats sont similaires à ceux de **Niangaly O. [42]** qui a retrouvé une activité à hauteur de 74,4% sur *Staphylococcus aureus* dans la population générale. Le cotrimoxazole peut aisément être encore utilisé chez le patient diabétique.

6.5.2. Niveau de résistance aux antibiotiques des *Escherichia coli* isolées des pus diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013

Escherichia coli représentaient également 26,1% de l'ensemble des germes isolés de nos prélèvements. Les résistances naturelles de *Escherichia coli* aux aminopénicillines, C1G, C2G, MLS, glycopeptides sont confirmées dans notre étude même si les résistances aux MLS et glycopeptides n'ont pas été vérifiées.

La majorité de ces *Escherichia coli* présentait une résistance très élevée aux bêtalactamines. La résistance à l'ampicilline était de 94,4% et de 72,2% pour l'association amoxicilline et acide clavulanique. Une résistance de 100% a été observée à la ticarcilline. L'association pipéracilline et tazobactam trouvait une plus faible résistance soit 38,9%. **Bougoudogo F. et al** retrouvaient aussi sur des études faites sur divers prélèvements, que *Escherichia coli* étaient moins sensibles aux pénicillines (ampicilline 11,8% ; amoxicilline + acide clavulanique 22,8%) **[43]**. Cette résistance marquée aux pénicillines atteignait bien évidemment les

céphalosporines avec des résistances de 94,4% à la cefalotine, 72,2% au cefotaxime et 66,6% à la ceftazidime retrouvées dans notre étude. La cefoxitine présentait un meilleur résultat de résistance soit 16,7%. Nos chiffres étaient inférieurs à ceux trouvés par **Bougoudogo F. et al** en 2007 pour les céphalosporines soit 70% de résistance pour la cefalotine **[43]**.

L'OMS a révélé dans son premier rapport sur la résistance aux antibiotiques datant du 30 avril 2014 en ce qui concerne la région africaine de l'OMS, la forte résistance d'*Escherichia coli* aux céphalosporines et fluoroquinolones de troisième génération – deux types de médicaments antibactériens essentiels et largement utilisés **[44]**.

En effet, dans notre étude également un niveau de résistance d'*Escherichia coli* bien élevé a été observé aux fluoroquinolones. Les quinolones se sont identifiés par leur similitude de pourcentage de résistance homogène à tous les antibiotiques du groupe testés soit 94,4% à l'acide nalidixique, la ciprofloxacine et l'ofloxacine.

Aucune résistance aux carbapénèmes notamment à l'ertapénème et à l'imipénème n'a été observée.

Le cotrimoxazole présentait un résultat de 88,9% comme niveau de résistance des *Escherichia coli* isolés. La résistance la plus faible observée fut celle au nitrofurantoïne soit 16,7%.

6.5.3. Niveau de résistance aux antibiotiques des *Proteus mirabilis* isolées des plaies diabétiques au LRM de janvier à décembre 2013

Proteus mirabilis représentaient 14,5% de l'ensemble de nos germes. Outre les résistances naturelles retrouvées chez toutes les entérobactéries que sont les résistances à : pénicilline G, glycopeptides, acide fusidique, macrolides (avec quelques exceptions), lincosamides, streptogramines, rifampicine, daptomycine et linezolide ; se sont ajoutées les particularités de *Proteus mirabilis* que sont les résistances naturelles à tigecycline, colistine, nitrofurantoïne des antibiotiques sur lesquels n'ont pas porté notre étude. Le germe a présenté une résistance élevée aux bêtalactamines notamment ampicilline et ticarcilline avec des pourcentages de résistance respectivement de 80 et 100%. Les inhibiteurs de bêtalactamases ont nettement amélioré ce niveau de résistance avec 30% pour l'association amoxicilline – acide clavulanique et 10% pour l'association pipéracilline – tazobactam. Ce résultat élevé aux bêtalactamines était également partagé par les céphalosporines (30% pour la cefalotine, 90% pour la cefoxitine, 50% pour cefotaxime et 70% pour la ceftazidime).

Le niveau de résistance à l'ertapénème était de 80%.

Un peu moins de 50% des *Proteus mirabilis* étaient résistants aux aminosides (10% à l'amikacine, et 40% pour gentamicine et la tobramycine).

La résistance aux quinolones était de 50% pour l'acide nalidixique, 40% à la ciprofloxacine et 50% pour l'ofloxacine.

Le niveau de résistance au cotrimoxazole pour les souches de *Proteus mirabils* était de 80%.

6.5.4. Niveau de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* isolée de pus diabétique au LRM de janvier à décembre 2013

La seule souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée a attiré notre attention par sa stricte résistance aux bêtalactamines et inhibiteurs de bêtalactamases associés ; un résultat qui soutient les données de la littéraure qui décrivent l'ampicilline, l'amoxicilline, l'amoxicilline –acide clavulanique ainsi que certains céphalosporines (céfotaxime et ceftriaxone) comme étant des antibiotiques auxquels *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant ; un résultat qui confirme juste l'efficacité de nos tests. Une sensibilité gardée aux pénèmes, aminosides et quinolones fut du moins observée. La grande inquiétude sur les souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème fut donc dissipée.

6.6. MULTIRESISTANCE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DES PUS DIABETIQUES AU LRM DE JANVIER A DECEMBRE 2013

6.6.1. *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline (SARM)

Au total, les *Staphylococcus aureus* représentaient 26,1% de l'ensemble de nos germes isolés et 50% de ces *Staphylococcus aureus* isolés étaient résistants à la méticilline. Ce chiffre de 50% s'avère très élevé et bien éloigné de celui trouvé dans la population générale où d'ailleurs une étude faite au niveau de deux grands CHU de Dakar par **Sow I. et al [45]** a révélé que le taux de prévalence de *Staphylococcus aureus* méticillino- résistants (SARM) était de 3,4%. La résistance à la vancomycine était retrouvée chez cette bactérie dans notre

étude dans 5,5% des cas. Cependant aucune souche isolée ne présentait à la fois une résistance à la méticilline et à la vancomycine.

6.6.2. Bactéries productrices de bêtalactamase à spectre élargi (BLSE)

La majorité des germes restant, représentée par les entérobactéries et non entérobactéries a également retenu notre attention du fait d'une configuration de BLSE hautement élevée. En effet, 27,5% des germes autres que *Staphylococcus aureus*, des entérobactéries présentaient un phénotype de résistance de type BLSE soit 20,3% de l'ensemble des germes isolés. L'étude réalisée par **Sow I. et al** en 2013 portant sur l'enquête sur la pratique de l'ABG et sur les phénotypes de résistance des espèces bactériennes prédominantes au Sénégal a signalé que plus de 14% des entérobactéries isolées étaient productrices de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) un chiffre inférieur au nôtre **[45]**. Les souches de *Escherichia coli* prédominaient cependant dans notre étude et représentaient 64,3% des EBLSE répertoriées suivies de *Klebsiella pneumoniae* 14,4%. Les souches de *Proteus mirabilis group*, de *Proteus vulgaris group* ainsi que de *Enterobacter cloacae complex* présentaient également ce type de configuration avec le même pourcentage soit 7,1%.

6.6.3. Bactéries multirésistantes (BMR)

Les souches de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline et de bactéries produisant des bêtalactamases à spectre élargi ont largement contribué à la définition de bactéries multirésistantes dans notre étude ; c'est-à-dire des souches bactériennes résistantes à au moins trois familles d'antibiotiques. Mais il faut souligner que toutes les bactéries productrices des BLSE ne sont pas forcément des bactéries multi résistantes (BMR).

Ainsi, 34,8% de l'ensemble des germes isolés étaient des bactéries multi résistantes (BMR). Parmi les souches de BMR identifiées, prédominaient les souches de *Staphylococcus aureus* qui représentaient 37,6% de nos BMR suivies de *Escherichia coli* 29,3% des BMR, et *Proteus mirabilis* 8,3%. D'autres bactéries figuraient dans ce classement. Il s'agit de *Klebsiella pneumoniae* 8,3% ; *Proteus vulgaris group* 8,3% ; *Pseudomonas aeruginosa* 4,1% et *Burkholderia cepacia group* 4,1% des souches identifiées comme multirésistantes. Le constat est que les entérobactéries tiennent une place importante des BMR. Sur la surveillance des BMR à partir du laboratoire étude pilote sur six mois au CHNU de Fann (Sénégal) **Sow I. et al** ont montré toutefois que 70,68% des BMR isolées étaient des entérobactéries productrices de bêtalactamase à spectre élargi (EBLSE) **[46]**.

7. CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

7.1 CONCLUSION

La surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries associées aux infections des plaies diabétiques est en place au LRM. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* étaient les bactéries multi-résistantes les plus couramment isolées des plaies diabétiques.

7.2 RECOMMANDATIONS

Aux autorités sanitaires

- Mettre en place une surveillance nationale des résistances bactériennes aux antibiotiques ;
- Réglementer la prescription et la dispensation des antibiotiques au Mali.

Au LRM

- Continuer cette étude en augmentant la taille l'échantillon et en incorporant des souches de contrôle ;
- Maintenir cette capacité de surveillance des pathogènes multi-resistants aux antibiotiques.

Aux Médecins et Pharmaciens

- Respecter les règles de bonnes pratiques médicales en évitant la prescription et la dispensation non adaptées d'antibiotiques aux patients.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1]. Fauchère JL, Avril JL. Bactériologie générale et médicale. Ellipses Edition Marketing S. A., Paris, 2002:170-173.

[2]. Bryskier A. Epidemiologie de la résistance aux antibactériens. In : Bryskier A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Paris : Ellipses, 1999 : 91.

[3]. Jones RN, Pfaller MA. Résistance bactérienne: Un problème dans le monde entier. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998**;** 31: 379-88.

[4]. Tenover FC. Développement et propagation de la résistance bactérienne aux antimicrobiens: Un aperçu. Clin Infect Dis, 2001**;** 33 (Suppl 3): 108S-15S.

[5]. www.infectiologie.org.tnpdflartescheri.pdf consulté le 11/02/14 à 22h35.

[6]. Picot S, Rakotomalala RS, Farny K, Simac C et al. Evolution of resistance to antibiotics from 1997 to 2005 in the Reunion Island. Med Mal Infect, 2010; 40(11): 617-24.

[7]. Elouennass M, Sahnoun I, Zrara A, Bajjou T and al. Epidemiology and susceptibility profile of blood culture isolates in an intensive care unit (2002-2005). Med Mal Infect, 2008 Jan; 38(1):18-24.

[8]. ANEH Guide référentiel en Antibiothérapie, juin 2011.

[9]. Most RS, Sinnock P. The epidemiology of lower extremity amputations in diabetic individuals. Diabete Care, 1983; 6: 87-91.

[10] CMIT. Infections ostéoarticulaires. In E. PILLY: Vivactis Plus Ed; 2008:287-295.

[11]. Rapport of World Health Organization consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. World Health Organisation, Department of non communicable disease surveillance. Geneva, WHO publications 1999, 59 pages.

[12]. Semneville E. Infection du pied diabétique. Rev Med Int, 2008 ; 29 : S243- S24

[13]. Armstrong DG, Todd WF, Lavery LA et al. The natural history of acute charcot's arthropathy in a diabetic foot specialty clinic. Diabet Med, 1997; 14: 357-363.

[14]. Flandrois JP, Chomarat M. L'examen bactériologique des suppurations. In Bacteriologie Medicales Pratiques Med SI/MC Graw. Paris, 1988.

[15]. Publications C. CLIN SUD- EST objectifs mains ; guide technique pour l'hygiène et la protection des mains ; octobre 2006. Données en ligne sur http://.biam2org/ banque des données automatisées sur les médicaments.

[16]. Carlson et coll. Revision with gentamicin impregnated cement for deep infections in total hip arthroplasties. J Bonejoint surg (Am), 1978; 60:1059-1064.

[17].Reseau Epibac. Surveillance des infections invasives à Hib, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* (B), *Streptococcus pyogenes* (A). Enfant métropolitaine. Données épidémiologiques 2004 http// www.invs.santé.fr/surveillance Epibac mise à jour en 2006.

[18]. Société Française de Microbiologie, Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, Recommandations 2007 (Edition de Janvier 2007). Données en ligne sur http://www.sfm.asso.fr/

[19]. www.cclinouest.com/Pages/Surveillance-BMR3-3.html consulté le 19/03/14.

[20].CMIT. Surveillance des maladies infectieuses en France. In E.PILLY: Vivactis Plus Ed ; 2008:672

[21]. Jonquet O, Corne P, Moulaire V, Landreau L. Pied et diabète. Sauramps Médical, 1998; 10: 73-76.

[22]. Logerfo FW, Coffman JD. Vascular and microvascular disease of the foot in diabetes: implications for foot care. N Eng J Med, 1984 ; 311 : 1615-9.

[23]. Ha Van G, Heurtier A, Bourgeon M et al. Pied diabetique. Encycl Med Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, Podologie, 27-140-A-10, 2000 : 16 pages.

[24]. Schleifer KM. Cocci Gram positif. In Holt JG, Mair NS and al. Bergey's Manual of systematic Bacteriology vol 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 385.

[25]. Verdier I, Gerard L, Gillet Y, Vandenesch F. Cours préparé au Centre National de Référence des Staphylocoques, INSERM E0230, Faculté de Médecine Laennec, Lyon.2001.

[26]. Flandrois JP, Couroil R, RAMUZ M, SIROT J et al. Bactériologie Médicale. Collection Azay, Lyon : Presses universitaires de Lyon, 1997 ; 112.

[27]. Expert rules in antinicrobial susceptibility testing, version 1, April 2008.

[28]. CMIT. Infections à staphylocoques. In E. PILLY: Vivactis Plus Ed; 2008: 326

[29]. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML and al. Manual of clinical microbiology vol 1. 9th edition. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2007: 740-741.

[30]. Jones EW, Edward S, Finch R et al. A microbiologic study of foot lesions. Diabet Med, 1984; 2: 213-5.

[31]. Lipsky BA, Pecoraro RE, Wheat LJ. The diabetic foot tissue and bone infection. Infect Dis Clin North Am, 1990; 4: 409-32.

[32]. Sapico FL, White JL, Canawati HN, Montgomerie JS and al. The infected foot of the diabetic patient: quantitative microbiology and analysis of clinical features. Rev infect Dis, 1984; 6: Suppl 1 : S 171- S 176.

[33]. Yki-jarvinen H. Role of insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM. Diabetologia, 1995; 38: 1378-1388.

[34]. Chantelau E, Altenhöfer F et al. Antibiotic treatment for uncomplicated neuropatic forefoot ulcers in diabetes: a controlled trial. Diabetic Med, 1996;13:156-159.

[35]. CMIT**.** Antibiotiques. In E. PILLY: Vivactis Plus Ed ; 2008 : 50-91.

[36]. CMIT. Le e-Pilly TROP, ouvrage français de reference en infectiologie tropicale élaboré sous l'égide du CMIT et édité par Alinéa Plus, est accessible via le site internet Infectiologie.com, rubrique formation, sous rubrique « livres » (http:// www.infectiologie.com/site/livres.php.)

[37]. Guide pour établir la surveillance en laboratoire de la résistance aux antimicrobiens. Programme de surveillance et Action contre les maladies. Groupe organique de Lutte contre la maladie. Organisation mondiale de la Santé. Bureau régional de l'Afrique. Brazzaville 2013.

[38]. http://fr.wikipedia.org/wiki/Bamako consulté le 05/04/2014 à18h32.

[39]. www.clustersantemali.net/docs/carte sanitaire 2011.pdf consulté le 05/04/2014 à19h06

[40]. Moss SE, Klein R, Klein B. The prevalence and incidence of lower extremity amputation in a diabetic population. Arch Intern Med, 1992; 152:610-6.

[41]. King H, Rewers M and the WHO ad hoc diabetes reporting Group. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults Diabetes Care, 1993; 16: 157-177.

[42]. Niangaly O. Les infections bactériennes dans les services de traumatologie à l'hôpital Gabriel Touré et à l'hôpital de Kati. Thèse de pharmacie, Bamako, 2009, 52p, N° 27.

[43]. Bougoudogo F et al. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées en routine des divers prélèvements à l'Institut National de Recherche en Santé Publique. African Society For Laboratory Medecine, 2013: 82.

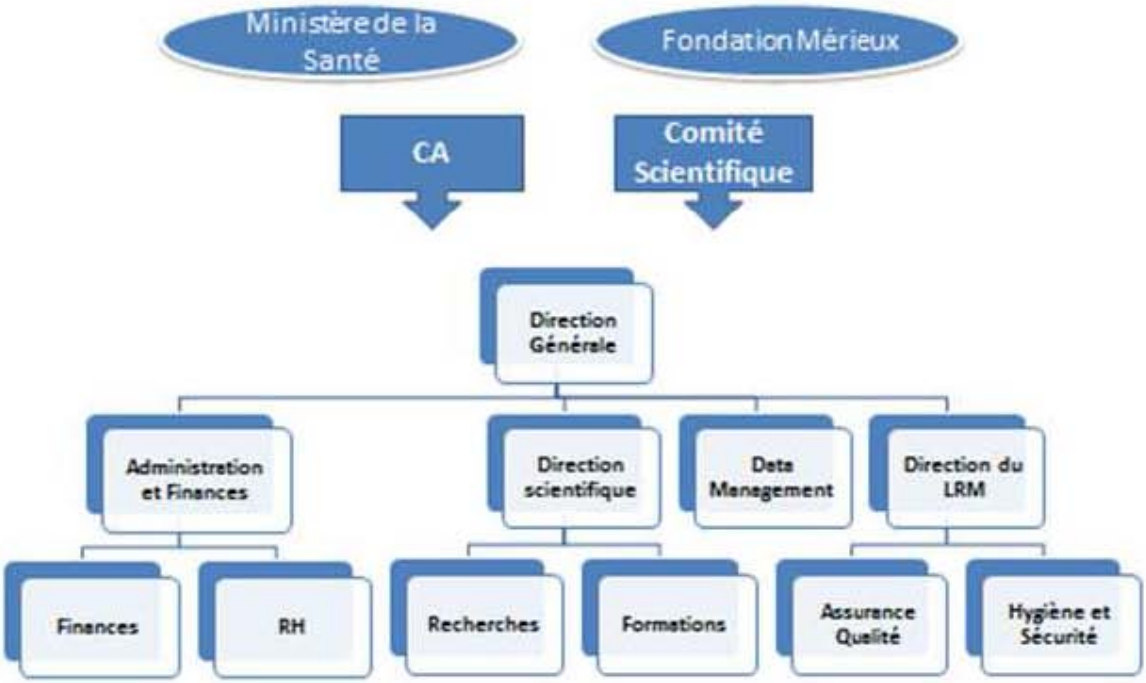
[44]. www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/ consulté le 23/06/14 à 7h55

[45]. Sow I et al. Enquête sur la pratique de l'ABG et sur les phénotypes de résistance des espèces bactériennes prédominantes au Sénégal. African Society For Laboratory Medecine, 2013: 50.

[46]. Sow I et al. Surveillance des BMR à partir du laboratoire étude pilote sur six mois au CHNU de Fann (Sénégal). African Society For Laboratory Medecine, 2013:81.

ANNEXES

Annexe n°1 : Organigramme du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux



ORGANIGRAMME DU C.I.CM

Annexe n°2 : Fiche d'enquête

FICHE D'ENQUETE DES SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES DE PUS PROVENANT DE PLAIES DIABETIQUES
(Laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako du 1er Janvier 2013 au 31 Décembre 2013.)

Fiche d'enquête n°

I- IDENTIFICATION DU PATIENT

Q1 : N°……..…

Q2 : Age (année)…….. 0 -19 ans☐ 20 – 39ans☐ 40 - 59ans☐ ≥ 60ans☐

Q3 : Sexe : Féminin ☐ Masculin ☐

Q4 : Domicile……

Q5 : Date d'isolement……

II- PRELEVEMENT

Q6 : Origine

- Communautaire…… ☐
- Centre National de Lutte contre le Diabète……... ☐
- Hospitalier…… ☐
- Autre à préciser…… ☐

Q7 : Germe isolé

- *Escherichia coli*…… ☐
- *Staphylococcus aureus*…….... ☐
- *Pseudomonas aeruginosa*……..…… ☐
- *Proteus mirabilis group*…….. ☐
- Autre à préciser…… ☐

Q8 : Réalisation de l'antibiogramme

- Vitek2…… ☐
- Mini Api…… ☐
- Autres…… ☐

III- ANTIBIOGRAMME

Antibiotiques		S	I	R	NT
BETALACTAMINES	Ampicilline				
	Amoxicilline/Acide clavulanique				
	Ticarcilline				
	Ticarcilline/ Acide clavulanique				
	Pipéracilline				
	Pipéracilline/Tazobactam				
	Cefalotine				
	Cefoxitine				
	Cefotaxime				
	Ceftazidime				
	Céfépime				
	Meropénème				
	Ertapénème				
	Imipénème				
AMINOSIDES	Amikacine				
	Gentamicine				
	Tobramycine				
QUINOLONES	Acide nalidixique				
	Ciprofloxacine				
	Ofloxacine				
	Levofloxacine				
AUTRES	Nitrofurantoïne				
	Trimethoprime/ Sulfaméthoxazole				
	Colistine				
	Fosfomycine				
	Rifampicine				

S = SENSIBLE
I= INTERMEDIAIRE
R= RESISTANTE
NT= NON TESTEE

IV- RESISTANCE

Q9 : Mécanisme

- Bêtalactamase à spectre élargi…… ☐
- Penicillinase de très haut niveau de résistance…… ☐
- Autres à préciser…… ☐

Q10 : Bactérie multi- résistante (BMR) : Oui ☐ Non ☐

Janvier 2014.

III'- ANTIBIOGRAMME POUR LES SOUCHES DE *Staphylococcus aureus*

ANTIBIOTIQUES		S	I	R	NT
BETALACTAMINES	Test cefoxitine screen+				
	Flomoxef				
	Benzylpenicilline				
	Cloxacilline				
	Flucloxacilline				
	Méthicilline				
	Oxacilline				
	Cefaclor				
	Cephapirine				
	Ceftibutène				
	Ceftizoxime				
	Ceftriaxone				
	Doripenem				
	Faropenem				
	Imipénème				
AMINOSIDES	Gentamicine				
	Tobramycine				
QUINOLONES	Eurofloxacine				
	Levofloxacine				
	Moxifloxacine				
MLS	Résistance inductible à la clindamycine				
	Dirithromycine				
	Erythromycine				
	Clindamycine				
	Lincomycine				
	Linézolide				
GLYCOPEPTIDES	Teicoplanine				
	Vancomycine				
CYCLINES	Doxycycline				
	Tetracycline				
	Tigecycline				
AUTRES	Fosfomycine				
	Nitrofurantoïne				
	Acide fusidique				
	Mupirocine				
	Rifampicine				
	Trimethoprime/Sulfamethoxazole				

IV'- RESISTANCE

Q9 : Mécanisme / Phénotype

- Vancomycine résistante…….. ☐
- Méthicilline résistante……. ☐
- Méthicilline et Vancomycine résistantes…… ☐
- Autres à préciser……. ☐

Q10 : Bactérie multi- résistante (BMR) : Oui ☐ Non ☐

Janvier 2014.

Annexe n°3 : Coloration de Gram

Titre – **MODE OPERATOIRE DE TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM** -
Version N° **1**

Rédigé le:	20/02/2013	Par :	Stagiaires-Pharmacie	
Vérifié le:	25/03/2013	Par :	KEITA Nana Kadidia OUEDRAOGO Judicaël KANOUTE Boula	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

☐ **Document provisoire** ☒ **Document opérationnel**

Destinataires

Biologiste	Responsable Assurance qualité	Responsable d'Hygiène et de sécurité	Responsables techniques	

Exemplaires : **- Classeur Assurance Qualité :**

- Classeur de Bactériologie/Parasitologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité

P: Procédure de réalisation des examens bactériologiques

MO: Mode opératoire de technique de coloration de Gram

E:

I. Buts

Décrire la technique de coloration de Gram

II. Domaines et personnels concernés

Le secteur de bactériologie et parasitologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DE 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 ;
   - 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 n°4 : Mode opératoire du test à l'oxydase

Titre – **MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OXYDASE** -Version N° 1

Rédigé le:	20/02/2013	Par :	Stagiaires-Pharmacie	
Vérifié le:	25/03/2013	Par :	KANOUTE Boula OUEDRAOGO Judicaël KEITA Nana Kadidia	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

☐ **Document provisoire** ☒ **Document opérationnel**

Destinataires

Biologiste	Responsable Assurance qualité	Responsable d'Hygiène et de sécurité	Responsables techniques	

Exemplaires : **- Classeur Assurance Qualité :**

- Classeur de Bactériologie/Parasitologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité

P: Procédure de réalisation des examens bactériologiques

MO: Mode opératoire du test à l'oxydase

E:

I. Buts

Décrire la technique du test à l'oxydase

II. Domaines et personnels concernés

Le secteur de bactériologie et parasitologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DU TEST DE L'OXYDASE

1. **Principe**

Le test de l'oxydase est basé sur la production bactérienne d'une enzyme oxydase intracellulaire.

En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif phénylènediamine, pour former un composé coloré en violet, l'indophénol.

L'acide ascorbique, incorporé dans le réactif, agit en tant qu'agent réducteur pour limiter l'auto-oxydation et améliorer la stabilité du réactif.

Cette formulation est basée sur la formule de la réactive oxydase de Kovac.

2. **Matériel**

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

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

4. **Echantillons**

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

5. **Protocole**
   - **Ouverture de l'ampoule**

     Placer le flacon compte-gouttes dans le briseur d'ampoule.

     Tapoter le fond du flacon pour éliminer les bulles qui auraient pu s'y former.

     Saisir le milieu de l'ensemble flacon/briseur et appuyer doucement pour briser l'ampoule.
   - **Réalisation du test**

     Distribuer précisément une goutte de réactif sur un disque non imprégné de diamètre 6 mm.

     Etaler la colonie sur le disque.
   - **Lecture et interprétation**

     L'apparition en 10 à 30 secondes d'une coloration allant de violet à pourpre indique un test positif.

     Des réactions tardives ou l'absence de couleur indiquent un test négatif.

6. **Contrôle de qualité**

   L'activité du réactif peut être testée à l'aide des souches suivantes cultivées sur géloses Trypcase-Soja(ou Drygalski) :

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

7. **Résultats attendus**

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

NB :

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

8. Gestion de déchets

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

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

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

Annexe n°5 : Mode opératoire du test de catalase

Titre – **MODE OPERATOIRE DU TEST DE CATALASE** -Version N° **1**

Rédigé le:	20/02/2013	Par :	Stagiaires-Pharmacie	
Vérifié le:	25/03/2013	Par :	KEITA Nana Kadidia OUEDRAOGO Judicaël KANOUTE Boula	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

☐ **Document provisoire** ☒ **Document opérationnel**

Destinataires

Biologiste	Responsable Assurance qualité	Responsable d'Hygiène et de sécurité	Responsables techniques	

Exemplaires : **- Classeur Assurance Qualité :**

- Classeur de Bactériologie/Parasitologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité

P: Procédure de réalisation des examens bactériologiques

MO: Mode opératoire du test de catalase

E:

I. Buts

Décrire la technique du test de catalase

II. Domaines et personnels concernés

Le secteur de bactériologie et parasitologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

Id-ase, réf : 55 561

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DU TEST DE CATALASE

(ID-ASE, REF : (55 561)

1. **Principe**

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

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

2. **Matériel**

   - Le réactif de catalase (R1) ;
   - La lame porte-objet ;
   - Le bâtonnet ;
   - La souche pure.

3. Contrôle de qualité

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

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

4. Protocole

Laisser les flacons revenir à température ambiante

➲ **Test sur lame**

- Déposer sur la lame une goutte d'ID color catalase ;
- Disperser 1 à 2 colonies dans la goutte ;
- A l'aide d'un bâtonnet, bien triturer

➲ **Test direct sur le milieu de culture**

Déposer une goutte d'ID color catalase directement sur la colonie.

5. Résultat

- La présence de catalase se matérialise par une production de bulles ;
- Les entérobactéries sont toutes des catalases positives, à l'exception de *Shigella dysenteriae* ;
- Les bacilles à Gram négatives non fermentaires sont en général, catalase positive telles que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*… ;
- Quelques cocci à Gram positif ont catalase positive comme les Staphylocoques.

6. Gestion des déchets

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

Annexe n°6 : Mode opératoire du test à l'optochine

Titre – **MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE** -Version N° **1**

Rédigé le:	20/02/2013	Par :	Stagiaires-Pharmacie	
Vérifié le:	25/03/2013	Par :	OUEDRAOGO Judicaël KEITA Nana Kadidia KANOUTE Boula	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

☐ **Document provisoire** ☒ **Document opérationnel**

Destinataires

Biologiste	Responsable Assurance qualité	Responsable d'Hygiène et de sécurité	Responsables techniques	

Exemplaires : **- Classeur Assurance Qualité :**

- Classeur de Bactériologie/Parasitologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité

P: Procédure de réalisation des examens bactériologiques

MO: Mode opératoire du test à l'optochine

E:

I. Buts

Décrire la technique du test à l'optochine

II. Domaines et personnels concernés

Le secteur de bactériologie et parasitologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

Réf : 55 912

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DU TEST A L'OPTOCHINE

REF : 55 912

1. **Principe**

   Ce réactif permet de tester la sensibilité des streptocoques vis-vis de l'optochine.

   L'espèce *Streptococcus pneumoniae* est généralement sensible à l'optochine contrairement aux autres streptocoques, en particulier les streptocoques alpha hémolytique.

2. **Matériel**

   - Jarre ;
   - Etuve bactériologique ;
   - Disque d'optochine.

3. **Conservation de disque**

- Les disques se conservent entre 2 – 8°C dans leur flacon jusqu'à la date de péremption ;
- Conserver à l'abri de la lumière ;
- Après ouverture, les disques se conservent 3 mois à 2 – 8°C dans leur flacon.

4. **Nature du prélèvement**

Le test est réalisé à partir d'un ensemencement en culture pure d'une souche isolée de streptocoques

5. **Contrôle de qualité**

L'activité des disques peut être vérifiée sur gélose au sang frais avec la souche suivante : *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6305. Avec la zone d'inhibition après 24heures à 37°C : 15 à 35mm.

6. **Protocole**

- Laisser le flacon de disques revenir à température ambiante ;
- A partir d'une ou plusieurs colonies de la souche à tester, ensemencer en tries serrées une boîte de gélose au sang afin d'obtenir des colonies confluentes ;
- Déposer un disque d'optochine à la surface de la boîte ensemencée ;
- Placer la boîte en atmosphère appropriée (enrichie en CO2) ;
- Incuber à l'étuve, couvercle en bas, à 37°C pendant 24heures.

7. **Résultat**

- **Lecture et interprétation**
  - Après incubation, observer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque d'optochine : Une zone d'inhibition supérieure ou égale à 15mm est une présomption de *Streptococcus pneumoniae* ;
  - l'identification du micro-organisme peut être poursuivie par des tests biochimiques et immunologiques, le VITEK® 2 Compact, le mini API®.

Annexe n°7 : Mode opératoire du test de coagulase

Titre: **MODE OPERATOIRE DU TEST DE LA COAGULASE**-Version N° 1

Rédigé le:	23/02/2013	Par : Doussou COULIBALY	DC	
Vérifié le:	25/03/2013	Par : Judicaël OUEDRAOGO	JO	Visa :
Approuvé le:		Par : Dr Daniel YALCOUYE	DY	Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

Document provisoire **X Document opérationnel**

Destinataires

D. YALCOUE	N. KEITA	A. MAIGA	A. CISSE	A. TOURE
O. HAIDARA	L. SIDIBE	K. DIARRA	J.OUEDRAOGO	B. KANOUTE

1. Principe :

Le BBL Coagulase Plasma, Rabbit (Plasma de lapin pour test de la coagulase BBL) servent à déterminer qualitativement la pathogénicité des staphylocoques par la méthode directe en tube.

Cette méthode consiste à mélanger une culture en bouillon de la veille ou des colonies prélevées sur une boîte de gélose non inhibitrice dans un tube de coagulase plasma réhydraté. Le tube est incubé à 37°C, la formation d'un caillot dans le plasma indique une production de coagulase.

2. Matériel :

- Tube sec ;
- L'oese ;
- Souche pure ;
- Bec bunsen ;
- Portoir tube ;
- Etuve ;
- Chronomètre.

3. Réactif :

Le coagulase Rabbit est un plasma de lapin lyophilisé contenant environ 0,85% de citrate de sodium et 0,85% de chlorure de sodium.

4. Conservation du réactif :

Le BBL coagulase plasma, Rabbit non ouvert se conserve entre 2 – 8°C

Le Plasma reconstitué se conserve à 2 – 8°C jusqu'à 14jours, ou aliquoter et congeler immédiatement à – 20°C jusqu'à 30jours, ne pas recongeler une fois décongeler.

5. Nature du prélèvement :

Les colonies pures sur une souche gélosé ou en bouillon.

6. Contrôle de qualité :

Les contrôles positifs et négatifs sont testés aux souches de références pour vérifier la conformité des performances du coagulase Plasma avec les spécifications.

Microorganisme	ATCC	Réaction
Staphylococcus aureus	25923	Caillot dans le tube
Staphylococcus epidermidis	12228	Absence de caillot dans le tube

7. Réalisation du test :

- Préparation des réactifs
  - Réhydrater le BBL Coagulase Plasma en ajoutant de l'eau purifiée dans le flacon comme indiqué ci-dessous puis mélanger en retournant alternativement le flacon.

Volume de produit	Eau purifiée stérile	Nombre approximatif de test
3 ml	3 ml	6
15 ml	15 ml	30
25 ml	25 ml	50

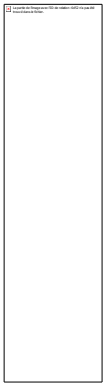
- Réalisation du test de BBL Coagulase
  - A l'aide d'une micropipette de 1 ml, ajouter 0,5 ml de BBL Coagulase Plasma, Rabbit réhydraté à un tube à culture sur un portoir ;
  - Ajouter environ 0,05 ml de culture en bouillon de la veille du microorganisme à tester dans le tube de plasma. Il est également possible, à l'aide d'un ensemenceur à anse plastique stérile, d'émulsifier complètement dans le tube de plasma 2 – 4 colonies prélevées sur une boîte de gélose ;
  - Mélanger doucement ;
  - Incuber au bain-marie ou à l'étuve à 37°C pendant 4heures ;

- Examiner périodiquement les tubes en les inclinant doucement. Ne pas agiter le tube pour ne pas risquer de désagréger le caillot et par conséquent, d'entrainer des résultats de test douteux ou faussement négatifs. **Tout degré de coagulation dans un délai de 3 – 4 heures doit être interprété comme un résultat positif.** De nombreuses souches productrices d'enzymes ne coaguleront le plasma qu'au bout de 24heures d'incubation.

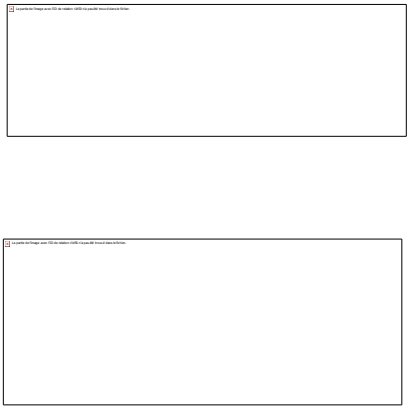
8. Résultat :

- **Si la coagulase est négative :** absence de formation de caillot, laisser jusqu'à 24heures sur la paillasse ;
- **Si la coagulase est positive :** le caillot ne se détache pas lorsque le tube est retourné. Suspicion de ***Staphylococcus aureus***.

Aspect avant Ensemencement



Aspect du test positif



Aspect du test négatif

9. Gestion des déchets :

Les objets tranchants sont jetés dans une boite de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (contaminant).

Annexe n°8: Mode opératoire de la technique du souchothèque

Titre – **MODE OPERATOIRE DE TECHNIQUE DU SOUCHOTHEQUE -** Version N° **1**

Rédigé le:	20/02/2013	Par :	Stagiaires-Pharmacie	
Vérifié le:	25/03/2013	Par :	OUEDRAOGO Judicaël KEITA Nana Kadidia KANOUTE Boula	Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Modifié le:		Par :		
Vérifié le :		Par :		Visa :
Approuvé le:		Par :		Visa :
Diffusé le :				
Objet de la modification:				
Archivé le :				

☐ **Document provisoire** ☒ **Document opérationnel**

Destinataires

Biologiste	Responsable Assurance qualité	Responsable d'Hygiène et de sécurité	Responsables techniques	

Exemplaires : **- Classeur Assurance Qualité :**

- Classeur de Bactériologie/Parasitologie

Documents Qualité liés:

MAQ: Manuel Qualité

P: Procédure de réalisation des examens bactériologiques

MO: Mode opératoire de technique du souchothèque

E:

I. Buts

Décrire le mode de technique du souchothèque

II. Domaines et personnels concernés

Le secteur de bactériologie et parasitologie. Tout le personnel susceptible d'utiliser cette technique

III. Abréviations/Définitions

IV. Références

V. Contenu

MODE OPERATOIRE DU SOUCHOTHEQUE

1. **Principe**

   Il permet de conserver les bactéries multi-résistantes à -80°C en présence de glycérol à savoir :
   - *Staphylococcus aureus* (Meti-R et Vanco-R) ;
   - *Pseudomonas aeruginosa ;*
   - *Salmonelles ;*
   - *Escherichiae coli ;*
   - *Klebsiella pneumoniae ;*
   - *Streptococcus pneumoniae.*
2. **Matériel**
   - Tube à hémolyse ;
   - Portoir tube ;
   - Micropipettes ;
   - Embouts ;
   - Cryotubes ;

- Tubes à vis ;
- Marqueur ;
- Congélateur (-80°C).

3. **Réactif**
   - Glycérol ;
   - ATB Médium.
4. **Nature du prélèvement**
   Souche pure des bactéries multi-résistantes.
5. **Enregistrement**
   Sur le cahier de souchothèque
6. **Protocole de l'analyse**
   A partir d'une souche pure de BMR :
   - Prendre un tube à hémolyse sur lequel on portera le numéro d'identification du patient et le nom de la bactérie à soucher ;
   - Prendre de l'ATB médium et remplir le tube à hémolyse jusqu'à moitié ;
   - Prélever à l'aide d'une oese quelques colonies isolées à partir de la purification qu'on introduira dans l'ATB médium, bien mélanger
   - Mettre cette suspension à 37° C pendant 24h à l'étuve ;
   - Prendre deux tubes de souchage (cryotube) ;
   - Mettre une étiquette portant le numéro de la souche correspondant aux trois premières lettres et chiffres du CODAT plus deux lettres de la souche plus le numéro d'ordre ;
   - Ex : W04ECO001 (premier E. coli souche en Avril 2012)
   - Prendre soin de porter l'enregistrement dans un classeur prévu à cet effet ;
   - Ensuite mesurer 800 µl de la suspension déjà préparée, mélanger avec 200 µl de glycérol puis vortexer et conserver le tout à -80° C ;
   - Faire le même pour les deux cryotubes.
7. **Conservation des échantillons**
   Les souchothèques sont conservées au congélateur à – 80°C
8. **Gestion des déchets**

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

FICHE SIGNALITIQUE

NOM : AHANOGBE

PRENOMS : Kokou Anani Lem

EMAIL : lemsahas2@yahoo.fr

TEL : (00223) 79114865 / (00228) 90002000

TITRE DE LA THESE : RESISTANCE BACTERIENNE EN CAS D'INFECTIONS DE PLAIES DIABETIQUES : DIAGNOSTIC ET SURVEILLANCE AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX DE BAMAKO

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2013-2014

VILLE DE SOUTENANCE : Bamako/Mali

LIEU DE DEPOT : Bibliothèque de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Bamako

SECTEURS D'INTERET : Bactériologie, Diabétologie, Santé publique.

RESUME

Titre : RESISTANCE BACTERIENNE EN CAS D'INFECTIONS DE PLAIES DIABETIQUES : DIAGNOSTIC ET SURVEILLANCE AU LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX DE BAMAKO.

Introduction : L'émergence de souches bactériennes multi résistantes est une situation préférentiellement grave pour le patient diabétique. Dans l'optique d'une surveillance des résistances aux antibiotiques en cas d'infections de plaies diabétiques, notre étude s'est fixé pour objectif d'identifier les bactéries responsables des suppurations, d'étudier leur sensibilité aux antibiotiques usuels, d'identifier si possible leurs phénotypes de résistance et enfin d'évaluer la capacité du LRM à participer à la surveillance de résistance.

Méthodologie : Notre étude s'est déroulée du 1er janvier 2013 au 31 décembre 2013 à Bamako et a concerné le Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM). Ce fut une étude transversale, prospective et descriptive portant sur des souches bactériennes isolées lors d'examens de pus provenant de plaies diabétiques. Nos antibiogrammes ont été réalisés à l'aide des automates VITEK®2 Compact et mini API®.

Résultats : Un total de 305 analyses de pus a été réalisé dont 58 concernaient les patients diabétiques soit une fréquence de 19,1%. Ces prélèvements de pus diabétiques dont l'essentiel (84,5%) a été réalisé au Centre National de Lutte contre le Diabète (CNLD) étaient pratiquement tous positifs à la culture soit 49 échantillons (84,5% des pus diabétiques analysés). Les 49 échantillons positifs qui se présentaient mono, bi et tri microbiens ont permis d'isoler 69 germes répartis en 18 germes différents avec une fréquence élevée de trois (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) soit 66,65% de l'ensemble des germes. Outres les résistances naturelles confirmées dans notre étude, des niveaux de résistance très élevés ont été observés aux antibiotiques testés. Pour *Staphylococcus aureus* : tétracyclyne 77,8% ; levofloxacine 72,2% ; érythromycine 61,1% ; imipénème 55,6% ; oxacilline 50% ; ceftriaxone 50% ; cotrimoxazole 33,3% ; moxifloxacine 33% ; linézolide 22% ; téicoplanine 22,2% ; acide fusidique 16,7% ; vancomycine 5,6% ; une résistance nulle à la tigecycline, le nitrofurantoïne et la fosfomycine. Pour *Escherichia coli* : ticarcilline 100% ; cefalotine 94,4% ; ciprofloxacine 94,4% ; cotrimoxazole 88,9% ; amoxicilline+acide clavulanique 72,2% ; cefotaxime 72,2%, ceftazidime 66,6% ; nitrofurantoïne 16,7% et une résistance nulle à l'ertapénème et imipénème. Pour *Proteus mirabilis* : ticarcilline 100% ; cotrimoxazole 80% ; ceftazidime 70% ; cefotaxime 50% ; ciprofloxacine 40% ; amoxicilline+ acide clavulanique 30% ; cefalotine 30% ;. La seule souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée a gardé sa sensibilité à l'imipénème. Pour la multirésistance, 50% des *Staphylococcus aureus* étaient des SARM ; 27,45% des entérobactéries soit 20,28% de l'ensemble des germes isolés étaient productrices de BLSE et 34,8% de l'ensemble des germes isolés étaient des BMR.

Conclusion : La surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries associées aux infections des plaies diabétiques est en place au LRM. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* étaient les bactéries multi-résistantes les plus couramment isolées des plaies diabétiques.

Mots-clés : antibiotiques, diabète, multi résistance, surveillance.

SUMMARY

Title: BACTERIAL RESISTANCE IN CASE OF DIABETIC WOUND INFECTIONS: DIAGNOSIS AND SUPERVISORY RODOLPHE MÉRIEUX LABORATORY IN BAMAKO.

Introduction: The emergence of multi-resistant bacterial strains is preferably a serious situation for the diabetic patient. In the context of surveillance of antibiotic resistance in infections of diabetic wounds, our study's objective is to identify the bacteria responsible for suppuration, to study their sensitivity to common antibiotics, identify if possible their resistance phenotypes and finally to assess the ability of RSM to participate in the monitoring of resistance.

Methodology: This study was conducted from 1st of January to 31st of December 2013 in Bamako and concerned the Rodolphe Mérieux Laboratory (LRM). This was a cross-sectional, prospective, descriptive study of isolated during examination of pus from diabetic wounds bacterial strains. Our susceptibility were performed using the VITEK ® 2 Compact and mini API ® controllers.

Results: A total of 305 analyses of pus was conducted which involved 58 diabetic patients a frequency of 19.1%. These samples could diabetics whose most (84.5%) was performed at the National Centre for the Fight against Diabetes (NCFD) were almost all culture positive 49 samples (84.5% of diabetics could be analysed). The 49 positive samples that had mono, bi and tri microbial have isolated 69 seeds in 18 different pathogens with a high frequency of three (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*) is 66.65% of the total germs. In addition to the natural resistance confirmed in our study, very high levels of resistance were observed in the tested antibiotics. *Staphylococcus aureus*: tetracyclyne 77.8%; levofloxacin 72.2%; erythromycin 61.1%; imipenem 55.6%; oxacillin 50%; ceftriaxone 50%; cotrimoxazole 33.3%; moxifloxacin 33%; linezolid 22%; teicoplanin 22.2%; fusidic acid 16.7%; vancomycin 5.6%; zero resistance to tigecycline, nitrofurantoin and fosfomycin. *Escherichia coli*: ticarcillin 100%; cephalothin 94.4%; ciprofloxacin 94.4%; cotrimoxazole 88.9%; amoxicillin+clavulanic acid 72.2%; 72.2% cefotaxime, ceftazidime 66.6%; nitrofurantoin 16.7% and zero resistance to ertapenem and imipenem. *Proteus mirabilis*: ticarcillin 100%; cotrimoxazole 80%; ceftazidime 70%; cefotaxime 50%; 40% ciprofloxacin; amoxicillin + clavulanic acid 30%; cephalothin 30%. The single strain of *Pseudomonas*

aeruginosa isolated retained its sensitivity to imipenem. For multidrug resistance, 50% of Staphylococcus aureus were MRSA; 27.45% or 20.28% of the Enterobacteriaceae of all nuclei were isolated ESBLs producing and 34.8% of all bacteria isolated were BMR.

Conclusion: Surveillance of antibiotic resistance-associated infections diabetic wounds bacteria is up to LRM. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* were multi-resistant bacteria most commonly isolated from diabetic wounds.

Keywords: antibiotics, diabetes, multiple resistance surveillance

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes 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 ;

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ;

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure.