

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



REPUBLIQUE DU MALI

UN peuple - Un But - Une Foi



UNIVERSITE DES SCIENCES DES TECHNIQUES ET DES
TECHNOLOGIES DE BAMAKO

Faculté de Pharmacie

FAPH

Année universitaire 2020 - 2021

Thèse N° :/.....

THEME

**Etude de la résistance aux antibiotiques des
bacilles à Gram négatif non fermentaires
au laboratoire Biotech de Bamako.**

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 23/07/ 2022

DEVANT LA FACULTE DE PHARMACIE

Par

M. Alassane Mahamane TOURE

POUR OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

(DIPLOME D'ETAT)

JURY

Président : Pr. Flabou BOUGOUDOGO

Membres : Dr. Mohamed AG BARAIKA

Dr. Amadou Makhan SARR

Co-directrice : Dr. Aminata MAÏGA

Directeur : Pr. Bourèma KOURIBA

Louange à **ALLAH** le tout puissant à qui je dois tout.

DEDICACES

Je dédie cet humble travail

À la mémoire de mes chers parents :

Merci pour tout ! Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Que Dieu repose vos âmes en paix !

REMERCIEMENTS

À la famille :

Merci pour votre soutien et pour votre aide durant toute ma vie estudiantine. En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous, recevez à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mes oncles, pour leur aide et encouragement sans cesse ; particulièrement à mon oncle Abdoul Djabar I Touré pour t'exprimer toute ma gratitude et te dis tout simplement : Merci

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire BIOTECH de Torokorobougou

Je tiens à remercier, Monsieur le Promoteur, Dr Amadou Makhan SARR

Pharmacien biologiste spécialisé en hématologie, biologie, immunologie générale et médicale, biochimie clinique, de m'avoir accueilli au niveau de son laboratoire pour son assistance morale et matérielle.

Mes remerciements s'adressent également à Docteur Mohamed AG BARAÏKA Pharmacien Microbiologiste, Maître -Assistant en Bactériologie-virologie à la Faculté de Pharmacie qui a accepté de suivre pas à pas ce travail, de guider chaque étape de sa réalisation, je l'en remercie profondément.

Je tiens à remercier aussi Dr Oumar Dicko pharmacien biologiste d'avoir accepté d'examiner ce travail pour ses aides et ses conseils.

Je remercie :

Mes camarades de la 12ème promotion de Pharmacie Elimane MARIKO

Aux personnels du laboratoire BIOTECH de Bamako

Assa, deya, sewo, kady, Oumou, Djeneba Diaw, Dr Adama Goïta, Salimata Traore, Aboubacrine Ag Rhissa, Amadou Dembele, Mme Sissoko Manda Fofana, Mme Dembele Aïssata Timbely, mon Oustaz Soumaïlla Konate, Mariam Diabaté, Ousmane Traore, Togola Tiémoko, Sissoko, Mohamed Diabaté pour l'accueil chaleureux au sein du BIOTECH, pour leur sympathie et la bonne collaboration.

Particulièrement à l'équipe de l'unité de bactériologie Mahamadou Diarra, Robert Djoné, Interne Assa Samaké pour leur accueil, leur aide et leur sympathie qui ont été des atouts précieux tout au long de ce parcours.

Aux personnels de laboratoire d'analyses médicales du CHU de Point G :

Merci pour votre accueil et votre soutien pour la réalisation de ce travail.

Aux personnels de l'officine de la pharmacie du 26 mars :

Nohou H Maïga, Mahamadou I Maïga, Aliou H Maïga, Idrissa Mahamar Diallo Mme Maïga Adama Hamida, Mme Maïga Boushira Moussa

Un grand merci à vous tous pour l'ambiance studieuse fraternelle et sympathique. Particulièrement à Dr Maïga Zeinab Zibo la promotrice de l'officine.

Sans oublier mes remerciements à tous ceux qui m'ont apporté leur soutien pour la réalisation de ce travail.

**HOMMAGE
AUX
MEMBRES DU JURY**

A Notre Maître et Président du jury,

Pr. Flabou BOUGOUDOGO

- **Maître de Conférences Agrégé de Bactériologie-Virologie**
- **Professeur Honoraire de la Faculté de Pharmacie**
- **Ancien Directeur de l'INRSP (de 2002 à 2012) actuel INSP**
- **Officier de l'Ordre du Mérite de la Santé.**

Cher maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury de thèse malgré vos multiples occupations. Votre rigueur et votre amour du travail bien fait font de vous un maître apprécié et respecté de tous. Nous vous prions de retrouver ici cher maître l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A Notre Maître et Juge,

Docteur Mohamed AG BARAÏKA

- **Maître -Assistant de Bactériologie-VBirologie à la Faculté de Pharmacie,**
- **Praticien au Centre de Recherche et de Lutte Contre la Drépanocytose (CRLD)**

Cher maître,

Nous ne saurons jamais trouver assez de mots pour témoigner notre reconnaissance, non seulement pour l'intérêt que vous portez à ce travail, mais aussi, la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger cette thèse. Veuillez accepter cher maître, le témoignage de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

A Notre Maître et Juge,

Docteur Amadou Makhan SARR

- Pharmacien Biologiste**
- Directeur de Laboratoire d'Analyses Biomédicales (BIOTECH)**
- Membre de la Société Malienne d'Hématologie et d'Oncologie (SOMAHO)**
- Membre de la Société Malienne de Pathologies thrombotiques et Hémorragiques (SOMAPATH)**

Cher maître :

Nous avons admiré vos qualités scientifiques et humaines tout au long de ce travail. Nous avons été séduits par votre qualité d'accueil et d'encadrement.

Homme de principe, votre rigueur scientifique fait de vous un maître exemplaire et reconnu de tous. Votre souci du travail bien fait nous a ramené à croire en nos propres capacités. Nous vous prions d'accepter ici l'expression de notre profond respect et de notre profonde gratitude.

A Notre Maître et Co-directrice de thèse

Docteur Aminata MAÏGA

- **Maitre-Assistante de Bactériologie-Virologie à la FMOS de l'Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB).**
- **Chef du Service du Laboratoire d'Analyses Biomédicales du CHU du Point G.**
- **Membre du groupe de coordination multifactorielle pour la lutte contre la résistance antibactérienne (RAM)**

Cher maître,

Vos qualités académiques et professionnelles font de vous une femme remarquable. Votre simplicité, votre sérénité, votre abord facile, votre esprit communicatif, votre rigueur scientifique, votre volonté de transmettre votre savoir aux jeunes, votre franchise font de vous un exemple à suivre. Veuillez trouver ici cher maître l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

A notre Maître et Directeur de thèse,

Professeur Agrégé Bourèma KOURIBA

- **Maître de Conférences Agrégé d'Immunologie à la Faculté de Pharmacie,**
- **Chef du DER des sciences Biologiques et Médicales**
- **Chef de l'Unité d'Immunologie Cellulaire et Moléculaire du MRTC/DEAP,**
- **Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles MERIEUX (CICM).**

Cher Maître,

Nous vous remercions d'avoir accepté de diriger ce travail. Nous avons été séduits par votre pédagogie, votre esprit critique et nous sommes fiers de l'enseignement de qualité que vous nous avez donnée.

Puisse Dieu vous donner une longue vie.

Abréviations

AARN : Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques

ARNm : Acide Ribo-Nucléique messenger

ATB : Antibiotique

A. baumannii : *Acinetobacter baumannii*

ABMR : *Acinetobacter baumannii* multirésistant

ADN : Acide désoxyribonucléique

AmpC : Gène de céphalosporinase

AN : Amikacine

APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II

ATM: Aztréonam

BCP : Bromocrésol pourpre (gélose BCP Lactose)

B cepacia : *Burkholderia cepacia*

BLSE : Betalactamase à spectre étendu (ou élargi)

BMR : Bactérie multirésistant

ATC : Anatomique, Thérapeutique, Chimique

BGP : Bactérie Gram Positif

BGN : Bacille Gram Négatif

BLSE : Betalactamase à Spectre Etendu

BMR : Bactéries Multi résistantes

C. lutéola : *Chryseomonas lutéola*

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CDC :
Center of Disease Control

CAZ : Ceftazidime

CIP : Ciprofloxacine,

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

C3G : Céphalosporine de 3 ième générations

CGP : Cocci Gram Positif

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DHFR : Dihydrofolate-Réductase

DMS : Durée Moyenne de Séjour

EPH : Etablissement Public Hospitalier

EARS : European Antimicrobial Résistance Surveillance

ECBU : Examen cyto bactériologique des urines

EOH : L'équipe opérationnelle d'hygiène

ERC : Entérobactéries Résistantes aux Céphalosporines de 3ème génération

ERV : Entérocoque Résistant à La Vancomycine

FEP: Céfepime,

H : Heure

HCASE : Hypersécrétion de Céphalosporinase

IN : Infection Nosocomiale

I: Intermédiaire,

JH : Journée d'Hospitalisation

LPS : Lipopolysaccharides

MLS : Macrolides-Lincosamimides-Streptogramines

NET : Netilmicine,

OMS : Organisation Mondiale de Santé

PAB : Para-Amino-Benzoïque

PAR : *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

% : pour cent

GM : Gentamicine

INSPEAR : Le réseau international pour l'étude et la prévention de la résistance aux antimicrobiens émergents

LCR : Liquide céphalo rachidien

LPS : Lipopolysaccharides

MGG: May-Grunwald Giemsa

PCR: Polymerase chain reaction

PDP : Prélèvement distal protégé

PLP : Protéines liant les pénicillines

R: Résistance,

S: Sensible,

SXT : Sulfaméthoxazole/Triméthoprime,

TIC: Ticarcilline,

PIP: Piperacilline,

TCC: Ticarcilline/acide clavulanique,

TE : Tétracycline,

TZP: Pipéracilline/Tazobactam,

TOB: Tobramicyne,

Liste des Tableaux

Tableau I: classification taxonomique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	19
Tableau II: Récapitulatif des phénotypes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux bêtalactamines.	24
Tableau III: Les principaux phénotypes de résistance possible aux fluoroquinolones pour <i>P. aeruginosa</i> et <i>Acinetobacter baumannii</i>	26
Tableau IV : classification taxonomique d' <i>Acinetobacter baumannii</i> :.....	27
Tableau V: Les disques d'antibiotiques testés.	39
Tableau VI: Répartition des patients selon le sexe.....	56
Tableau VII: fréquence d'isolement des espèces des Bacilles à Gram négatifs non fermentaires.	57
Tableau VIII: Résistance aux β -lactamines des souches fréquemment isolées.	58
Tableau IX: Résistance aux aminosides des souches BGNnF fréquemment isolées.....	59
Tableau X: Résistance aux fluoroquinolones des souches de BGNnF fréquemment isolées. .	59
Tableau XII : prévalence des bactéries multi-résistantes des BGNnF.....	60
Tableau XIII: Phénotypes de résistance des BGNnF isolées aux β -lactamines.	60
Tableau XXI: Phénotypes de résistance des BGNnF isolées aux Aminosides et Fluoroquinolones.....	61

Liste des Figures

Figure 1: Noyau β -lactame	9
Figure 2 : Noyau des sous-familles	9
Figure 3: Les carbapénèmes	12
Figure 4 : Structure de base des quinolones	14
Figure 5 : Les quinolones	14
Figure 6 : Structure générale des aminosides.....	16
Figure 7 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique.	20
Figure 8: Colonies pigmentées de <i>P. aeruginosa</i>	20
Figure 9 : Colonies non pigmentées de <i>P. aeruginosa</i>	20
Figure 10: <i>Acinetobacter baumannii</i> vue au microscope électronique.	28
Figure 11: Colonies d' <i>A.baumannii</i>	28
Figure 12: Colonies de <i>B.cepacia</i> sur gélose de sang	32
Figure 13: Flacon de prélèvement à usage unique pour les urines (à gauche) et pour les crachats à droit.	37
Figure 14: Uriselect.....	38
Figure 15: Eosine méthylène Blue	38
Figure 16: <i>A.baumannii</i> sur Uriselect	42
Figure 17: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur Uriselect.....	43
Figure 18: <i>B. cepacia</i> sur Uriselect	43
Figure 19: Automate VITEK® 2 Compact.	50
Figure 20 : Image d'identification d'une souche de <i>Acinetobacter</i> spp avec la galerie API N20E.....	52
Figure 21 : Répartition des patients selon les tranches d'âge.....	56
Figure 22: <i>Fréquence de la nature de prélèvement</i>	57

Table des matières

1.Introduction	2
2.Objectifs	5
2.1.Objectif général :.....	5
2.2.Objectifs spécifiques :.....	5
3.Généralités.....	7
3.1. Les antibiotiques.....	7
3.2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	18
3.3. <i>Acinetobacter baumannii</i> :.....	26
3.4. <i>Chryseomonas lutéola</i> :	30
3.5. <i>Burkholderia cepacia</i> :.....	31
4- Méthodologie	35
4.1. Cadre d'étude	35
4.2. Type et période d'étude.....	35
4.3.Population d'étude :.....	35
4.4. Variables étudiées.....	36
4.5. Méthode d'étude:.....	36
4.6. Matériels.....	36
4.7. Techniques utilisées	39
5.Résultats	56
5.1. Résultats Socio-démographiques	56
5.2. Résultats Bactériologiques.....	57
5.3. Fréquence selon la nature de prélèvement	57
6.Discussion :	63
6.1. Méthodologie.....	63

6.2	Caractéristiques de la population de notre étude:	63
6.3.	Fréquence d'isolement des souches de BGNnF durant la période d'étude...	64
6.4.	Résistance aux antibiotiques des germes isolés au cours de notre période d'étude :	64
6.5.	Fréquence d'isolement des bactéries multi-résistantes (BMR) :	65
7.	Conclusion :	69
8.	Recommandations :	71
9.	Références bibliographique	72
10.	ANNEXES	77
	FICHE D'ENQUETE :	79
	FICHE SIGNALETIQUE :	82
	SERMENT DE GALIEN	83

INTRODUCTION

1. Introduction

Les antibiotiques sont les médicaments les plus prescrits et constituent une des sources de dépenses liées à la santé. Leur utilisation a eu donc des incidences économiques qui dépassent la médecine humaine.

En effet, il est admis que 50% du tonnage antibiotique utilisé dans le monde est lié aux prescriptions chez l'homme, l'autre 50% étant lié à l'utilisation dans le domaine animal. S'agissant des prescriptions humaines, il est généralement admis que 20% est lié à l'utilisation hospitalière, le 80% restant représente les prescriptions dans la communauté(1). Au cours de ces dernières années, la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un problème d'importance croissante en pratique médicale(2).

Son épidémiologie dans le monde est marquée par la dissémination qui est à l'origine d'une augmentation considérable de la mortalité, de la morbidité ainsi que du coût des traitements(3).

Parmi les germes responsables d'infections bactériennes, nous avons les bacilles à Gram négatif non fermentaires qui par définition n'utilisent pas les hydrates de carbones comme source d'énergie où ils les utilisent via des voies métaboliques autres que la fermentation (4). Le groupe comprend plus d'une soixantaine de genres, regroupant chacun un nombre variable d'espèces.

En médecine, les espèces les plus fréquemment rencontrées sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, ainsi que les espèces des genres *Bordetella*, *Burkholderia* et *Moraxella*(4).

Au Cameroun, la prévalence de bacilles à Gram négatifs non fermentaires était de 7,4% en 2014 selon Ebongue et al(5).

Au Burkina en 2016 selon une étude réalisée sur le profil bactériologique des infections du site opératoire au centre hospitalier universitaire Souro Sanou de Bobo Dioulasso la prévalence des bacilles à Gram négatifs non fermentaires par Ouédraogo et al était de 16,5 %(6).

Cependant selon une étude menée à l'INSP en 2019, sur un ensemble de 583 bactéries isolées. *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* ont représenté 13% des souches isolées. D'autres espèces de bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia*...) ont été isolées mais n'ont pas été prise en compte(7).

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. Elle peut toucher toute personne, à n'importe quel âge et dans n'importe quel pays. La résistance aux antibiotiques est un phénomène naturel mais le mauvais usage de ces médicaments chez l'homme et l'animal accélère le processus entraînant une prolongation des hospitalisations, une augmentation des dépenses médicales et une hausse de la mortalité(8). Cela représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la mise en place de cette étude pour évaluer le profil de la résistance de bacilles à gram négatifs non fermentaires isolés à Bamako.

OBJECTIFS

2. Objectifs

2.1. Objectif général :

Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches des bacilles Gram négatif non fermentaires isolées de mars 2020 à mars 2021 au laboratoire Biotech de Bamako.

2.2. Objectifs spécifiques :

- 1) Déterminer la fréquence des souches des bacilles gram négatif non fermentaires isolées,
- 2) Déterminer la fréquence des bacilles gram négatif non fermentaires multi résistants.
- 3) Identifier les profils de résistance aux antibiotiques des souches des bacilles gram négatifs non fermentaires ;
- 4) Déterminer les phénotypes de résistance des souches des bacilles gram négatif non fermentaires isolées.

GENERALITES

3. Généralités

3.1. Les antibiotiques

Définition :

Les antibiotiques sont des substances anti microbiennes d'activité sélective, toxiques pour les bactéries et non toxiques pour l'hôte, ayant un site d'action bien défini et un mécanisme précis permettant leur utilisation dans le traitement de la majorité des infections(9).

Les antibiotiques sont des substances antibactériennes relativement peu toxiques pour l'organisme, agissant à faible dose. Ils peuvent être d'origine biologique élaborés par des microorganismes (champignons et diverses bactéries), semi-synthétiques préparés par modification chimiques de produits naturels, ou synthétique (substances chimiques de synthèse). Ils ont une action spécifique sur une cible moléculaire précise de la bactérie(9).

3.1.1. Classification des antibiotiques :

Il existe plusieurs critères de classification des antibiotiques.

- Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs origines, on distingue donc des antibiotiques naturels, les antibiotiques semi-synthétiques et les antibiotiques synthétiques.
- Ils peuvent aussi être classés selon leur effet ; ils sont dits bactériostatiques quand ils agissent par arrêt de la croissance de la bactérie, et bactéricides quand ils agissent en tuant la bactérie.
- Les antibiotiques peuvent être classés selon leur spectre d'activité ; on a les antibiotiques à spectre large qui agissent sur les bacilles à Gram positif (BGP), les bacilles à Gram négatif (BGN), les cocci à Gram positif (CGP) et les cocci à Gram négatifs (CGN). Ils sont dits spectres étroits quand le spectre est limité à un ou deux des groupes précédents.

Les antibiotiques à spectre large : ils sont efficaces sur un grand nombre de types d'agents pathogènes. Ils sont actifs sur une grande partie de tous les Cocci et tous les bacilles ; et utilisés lorsque la bactérie n'est pas encore identifiée.

Les antibiotiques à spectre étroit : ils sont efficaces sur un nombre limité d'agents infectieux leur permettant de cibler une pathologie en particulier

Cette activité antibactérienne est caractérisée par :

- Une concentration minimale inhibitrice (CMI) : c'est la faible concentration d'un antibiotique dont le développement est empêché après 24h d'incubation, elle indique le pouvoir bactériostatique.

- Une concentration minimale létale (CML) ou bactéricide (CMB) : c'est la faible concentration qui entraîne la mort de 99,9% des bactéries, elle indique le pouvoir bactéricide.

On détermine l'activité intrinsèque d'un antibiotique selon le rapport CMB/CMI :

- $CMB/CMI \leq 2$ Antibiotique bactéricide
- $CMB/CMI = 4$ à 16 Antibiotique bactériostatique
- $CMB/CMI > 16$ Bactérie dit "tolérante" à l'antibiotique
- Les antibiotiques peuvent être classés selon le site d'action. On distingue ainsi les antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne (bêtalactamines, glycopeptides, bacitracines, fosfomycine), les antibiotiques actifs sur la membrane cytoplasmique (polymyxines), les antibiotiques actifs sur la synthèse protéique bactérienne (aminosides, macrolides, cyclines, phénicolés, acides fusidique), les antibiotiques actifs sur la synthèse de l'acide nucléique (quinolones, nitro-imidazolés, sulfamides, rifampicine)(10).

3.1.2. Les grandes familles d'antibiotiques utilisées contre les BGN :

3.1.2.1. Les β -lactamines :

Ils constituent la famille d'antibiotique la plus utilisée en antibiothérapie, qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame, cette large utilisation est due à leur large spectre d'action, leur faible toxicité, leur efficacité et à leur faible coût pour certaines molécules, elle regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames.(11)

- Mécanisme d'action :

Les bêtalactamines sont des antibiotiques bactéricides qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les transpeptidases et carboxypeptidases, enzymes associées à la membrane cytoplasmique, fixent de façon covalente ces antibiotiques. Cette liaison est due à une analogie structurale entre le substrat naturel de ces enzymes, l'acyl-D-alanyl-D-alanine et le cycle bêta-lactame. Ces enzymes qui lient les pénicillines et les céphalosporines, sont également dénommées protéines de liaison aux pénicillines (PLP). La nature de ces PLP est relativement spécifique d'espèce et leur nombre varie d'une espèce bactérienne à une autre. Chacune a une fonction bien définie, mais une ou plusieurs d'entre elles jouent un rôle prépondérant dans la synthèse du peptidoglycane. Les bêtalactamines atteignent facilement leur cible chez les bactéries à Gram positif car la diffusion de ces molécules à travers le peptidoglycane se fait passivement. En revanche, chez les bactéries à Gram négatif, ces antibiotiques doivent, avant de diffuser dans le peptidoglycane, franchir la membrane externe hydrophobe. Le passage à travers cette barrière des bêta-lactamines, composés généralement hydrophiles, se fait par l'intermédiaire de véritables canaux protéiques, les porines.

3.1.2.2. Classification des β -lactamines :

Elle représente une vaste famille d'antibiotique bactéricide qui doit son nom au cycle β -lactame

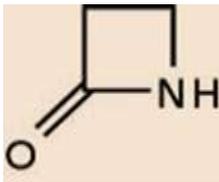


Figure 1 : La formule chimique. de Noyau β -lactame.

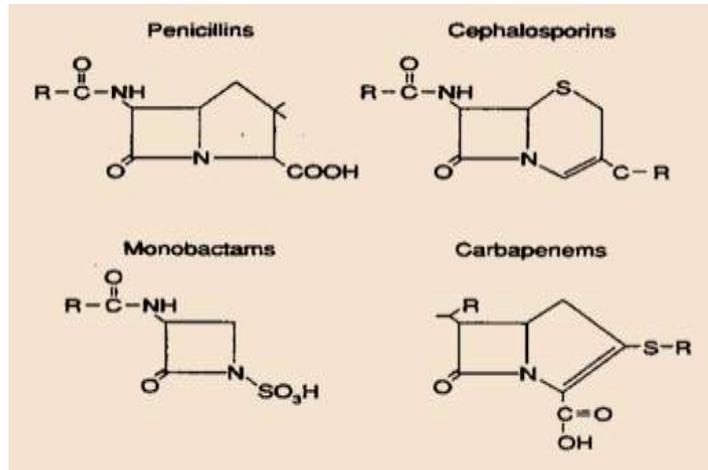


Figure 2 : Noyau des sous-familles d'antibiotiques

3.1.2.3. Les pénicillines (pénames) :

L'acide 6-aminopénicillanique est le noyau de base des pénicillines, sur base de la nature des substituant et de ses conséquences, il existe plusieurs classes de pénicilline : pénicillines sensibles aux pénicillinases « pénicilline G et V » pénicilline résistante aux pénicillinases « pénicilline M », pénicillines à spectre élargi « pénicillines A », pénicillines antipseudomonas « carboxypénicillines et uréidopénicillines » et amidino-pénicillines.

3.1.2.4. Les céphalosporines (céphèmes)

Les céphèmes constituent une sous-famille des bêtalactamines communément appelé céphalosporines dérivées de l'acide 7 amino-céphalosporanique. Plusieurs céphalosporines existent et sont classés en génération. On distingue ainsi à ce jour 5 générations de céphalosporines. Ils possèdent un large spectre d'activité sur les bacilles à Gram négatif ; on distingue quatre générations classées en fonction de leur date d'apparition.

- Céphalosporines de première génération :

Ce sont des antibiotiques utilisables par voie orale ou par voie parentérale (IM/IV) et sont : exemple de céfaclor, céfadroxil, céfalexine, céfalotine, céfapirine, céfatrizine, céfazoline, céfradine. Des résistances naturelles aux céphalosporines de 1^{ère} génération sont observées chez bactéries suivantes : SARM, entérocoques, entérobactéries groupes 3 et 4 Pseudomonas, *Campylobacter*, *Listeria*, *Legionella*, *Clostridium difficile*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*,

Chlamydia. Elles sont indiquées dans les infections ORL, respiratoires, urinaires, ostéo-articulaires, cutanés à l'exception des méningites

- **Céphalosporines de deuxième génération :**

Comprennent la céfuroxime, le céfamandole, et la céfoxitine. Ils ont un spectre d'activité identique au C1G et présentent une résistance accrue vis-à-vis des céphalosporinases des bacilles à Gram négatif. Ils sont inactifs sur *P. aeruginosa*.

- **Céphalosporines de troisième génération :** Céfotaxime, Ceftriaxone, Ceftazidime, Cefsulodine, céfopérazone, Cefpodoxime, Céfixime, Latamoxef (Oxacéphèmes). Ils ont un spectre d'activité large, très active sur l'ensemble des entérobactéries, et active sur *H. influenzae* et *P. aeruginosa*. Ils sont inactifs sur les entérocoques, *Listeria*, *Legionella*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium*, *Chlamydia*. Ils sont inactifs sur les SARM, sur *Listeria monocytogenes* et sur *Acinetobacter*.

3.1.2.5. Mécanisme de résistance

La résistance acquise des bactéries aux bêtalactamines peut être la conséquence de trois mécanismes distincts :

- l'inactivation de la molécule par une enzyme ouvrant le cycle bêta-lactame (bêta lactamase)
- l'imperméabilité de la paroi à l'antibiotique ;
- la modification de l'affinité des PLP pour l'antibiotique. Chez les bactéries à Gram négatif, les bêta-lactamases sont très nombreuses dans le monde bactérien et sont localisées dans l'espace périplasmique, alors que chez les bactéries à Gram positif, elles sont sécrétées dans l'environnement bactérien. Schématiquement, les bêta-lactamases peuvent être individualisées en pénicillinases et céphalosporinases. Les pénicillinases hydrolysent préférentiellement les pénicillines, tandis que les céphalosporinases inactivent non seulement certaines céphalosporines mais aussi les pénicillines. Les gènes codant pour les pénicillinases sont portés par le chromosome bactérien, ou bien par des plasmides ou des transposons. Les gènes de résistance d'information chromosomique sont non transférables et spécifiques d'espèce, alors que ceux d'information plasmidique ou liés à un transposon peuvent diffuser entre souches de même espèce, voire d'espèces différentes par transfert génétique. Les céphalosporinases sont retrouvées uniquement chez les bactéries à Gram négatif et leur synthèse est gouvernée par des gènes chromosomiques. Chez certaines espèces bactériennes, la céphalosporinase est produite en faible quantité, mais sa production peut être augmentée en présence de l'antibiotique (céphalosporinase inductible) : l'antibiotique inhibe alors le répresseur qui normalement assure la régulation de la synthèse de l'enzyme. L'imipénème, la céfoxitine, l'acide clavulanique sont de puissants inducteurs alors que la pipéracilline et la céfopérazone sont peu inducteurs. Plus

rarement, une céphalosporinase peut être « déréprimée », comme cela a été observé pour certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*, d'Entérobactérie, de *Citrobacter* et de *Serratia*. Dans ce cas, le répresseur est inactif ou bien l'opérateur est devenu insensible au répresseur par mutation chromosomique :

La céphalosporinase est alors produite indépendamment de la présence de la bêta- lactamine. La possibilité de sélectionner au cours d'un traitement par une céphalosporinase des mutants « déréprimés » existe donc et rend impérative l'association de cette céphalosporine avec un autre antibiotique (aminoside par exemple).

- La résistance acquise aux bêta-lactamines par modification de la cible, c'est -à - dire des PLP, est observée surtout avec les bactéries à Gram positif. Elle peut être la conséquence d'une modification de la structure d'une PLP essentielle, entraînant une réduction de son affinité pour l'antibiotique ou de l'augmentation importante de la synthèse d'une PLP essentielle qui ne peut être saturée que par une quantité plus importante d'antibiotique. Il peut aussi s'agir de l'apparition d'une PLP qui, fonctionnellement, se substitue à une ou plusieurs PLP essentielles et dont l'affinité pour l'antibiotique est faible. L'association de ces mécanismes est possible. Ce type de résistance est dû à une mutation de gènes chromosomiques ou à l'acquisition de nouveaux gènes par transfert génétique. La résistance peut être liée à une mutation chromosomique affectant la synthèse d'une porine ou d'un lipopolysaccharide, réduisant ainsi la perméabilité de la membrane externe et perturbant le transport intra pariétal des bêtalactamines : l'antibiotique ne peut plus atteindre sa cible. Le système d'efflux est constitué par une pompe moléculaire qui permettrait aux bactéries d'une part de rejeter des composés toxiques endogènes, d'autre part de disposer d'un mécanisme de défense contre des substances exogènes libérées par l'environnement (antibiotique par exemple).

3.1.2.6. Les carbapénèmes :

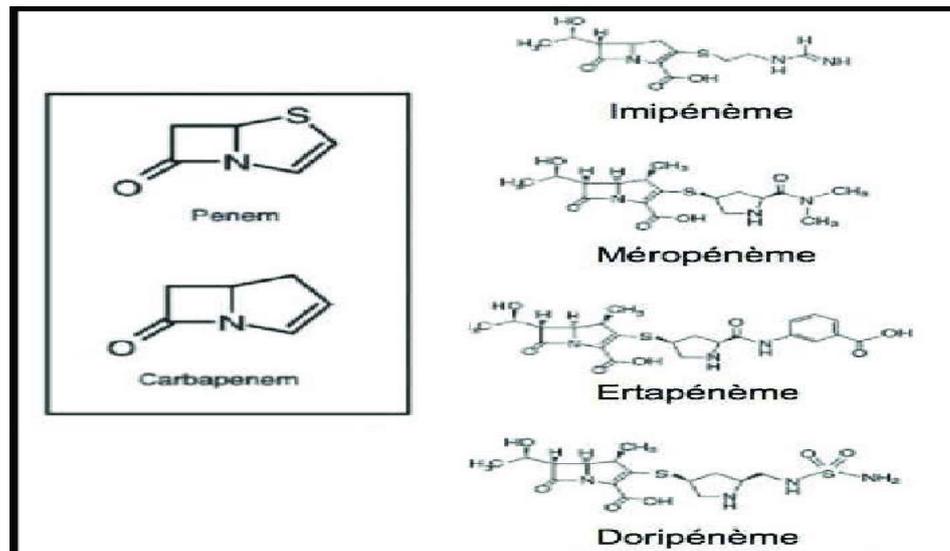


Figure 3: Les formules chimiques des carbapénèmes

Dans ce groupe le chef de file est l'imipénème. Ils représentent un très large spectre d'activité et une grande stabilité « imipénème,méropénème » ; ils sont considérés comme le traitement de choix des infections sévères à bactéries à Gram négatif. L'imipénème est très actif sur un grand nombre d'espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif. L'imipénème est résistant à la plupart des β -lactamases, y compris les β -lactamases à spectre élargi. Il est cependant inactif sur les staphylocoques méti-R, sur *Sténotrophomonas maltophilia* et de nombreuses souches de *Burkholderia cepacia*. Des résistances acquises sont apparues chez *P. aeruginosa*. De très rares souches d'entérobactéries et d'*Acinetobacter* capables de dégrader l'imipénème ont été décrites(11).

3.1.2.7. Les monobactames :

Ils sont des β -lactames monocycliques, l'Aztréonam est une molécule administrée par voie parentérale inactifs sur les bactéries à Gram positif et les anaérobies et très actifs sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*, les monobactames constituent les seules β -lactamine non hydrolysées par les métallobactamases, exemple d'Aztréonam.

3.1.2.8. Les β -lactamases :

Les β lactamases sont des enzymes bactériennes qui catalysent l'hydrolyse de la liaison amide du cycle lactame des antibiotiques de la famille des β lactamines, les gènes qui codent pour ces enzymes sont d'origine chromosomique ou plasmidique, ces gènes sont ainsi détectés sur des transposons et des intégrons facilitant le transfert horizontal de ces gènes entre espèces phylogénitiquement éloignées, les β lactamases sont la principale cause de résistance

Thèse Pharmacie 2021-2022 Alassane Mahamane Touré 12

bactérienne aux pénicillines et au céphalosporines c'est un mécanisme très répandu des bactéries vis-à-vis des β lactamines.

3.1.2.9. Inhibiteurs des β lactamases :

L'acide clavulanique, le Sulbactam et le Tazobactam sont des inhibiteurs de divers β lactamases à médiation plasmidique ; depuis la découverte et le développement de l'acide clavulanique en tant qu'inhibiteur irréversible des enzymes de classe A les plus répandues, les combinaisons inhibitrices de la pénicilline ont été largement utilisés pour traiter les infections communautaires et en particulier les infections liées aux soins de santé par des organismes producteurs de β lactamase(12).

3 .1. 3 Quinolones :

Les **quinolones** et **fluoroquinolones** forment une large classe d'antibactériens de synthèse qui comprend les dérivés de l'acide nalidixique découvert en 1962 et utilisé chez l'homme dès l'année suivante. Cette famille d'antibactériens a fait l'objet de recherches très importantes aboutissant au dépôt de plus de 10 000 brevets. L'ajout de l'atome de fluor dans les années 1970 a permis d'augmenter fortement la pénétration des molécules quinolones dans les cellules (jusqu'à 200 fois plus) : ce fut la naissance des fluoroquinolones, puissants antibiotiques capables de lutter contre une grande variété de germes chez l'homme et l'animal. Elles inhibent des topo- isomérase, enzymes intervenant dans la conformation de l'ADN, et plus particulièrement la top-isomérase II (ou ADN gyrase) et la topoisomérase IV. Elles se fixent sur le complexe formé par la topoisomérase et l'ADN.

Les quinolones possèdent en commun un cycle A de type pyridinone 4 associé à un cycle aromatique B. La nature du cycle B (pyridine, pyrimidine ou benzène) permet de distinguer trois sous- familles de quinolones :

- les naphthyridines : acide nalidixique, énoxacine
- les pyrimidino-pyridines : acide piromidique, acide pipémidique
- les quinoléines : acide oxolinique, fluméquine, rosoxacine, norfloxacin, péfloxacin

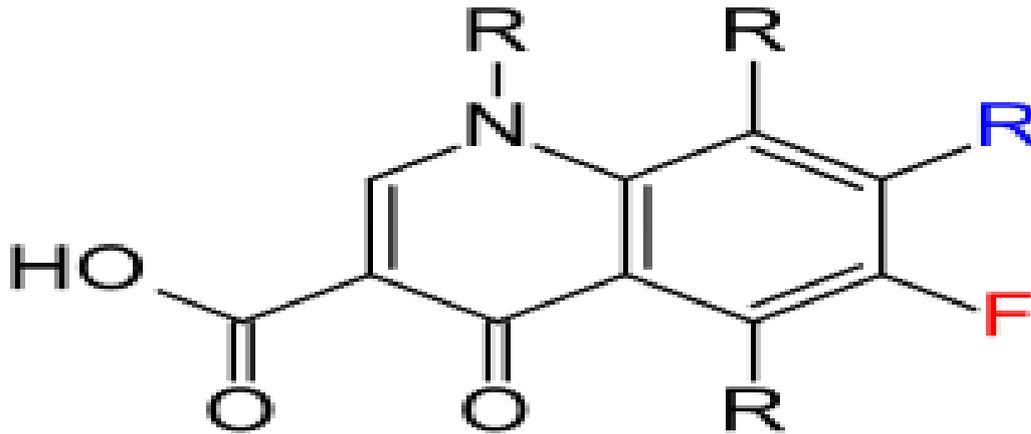


Figure 4 : Structure chimique de base des quinolones

Le groupe R (bleu) est assez souvent un groupe *pipérazine*; si la molécule est liée à un fluor en position 6 (rouge), il s'agit d'une fluoroquinolone

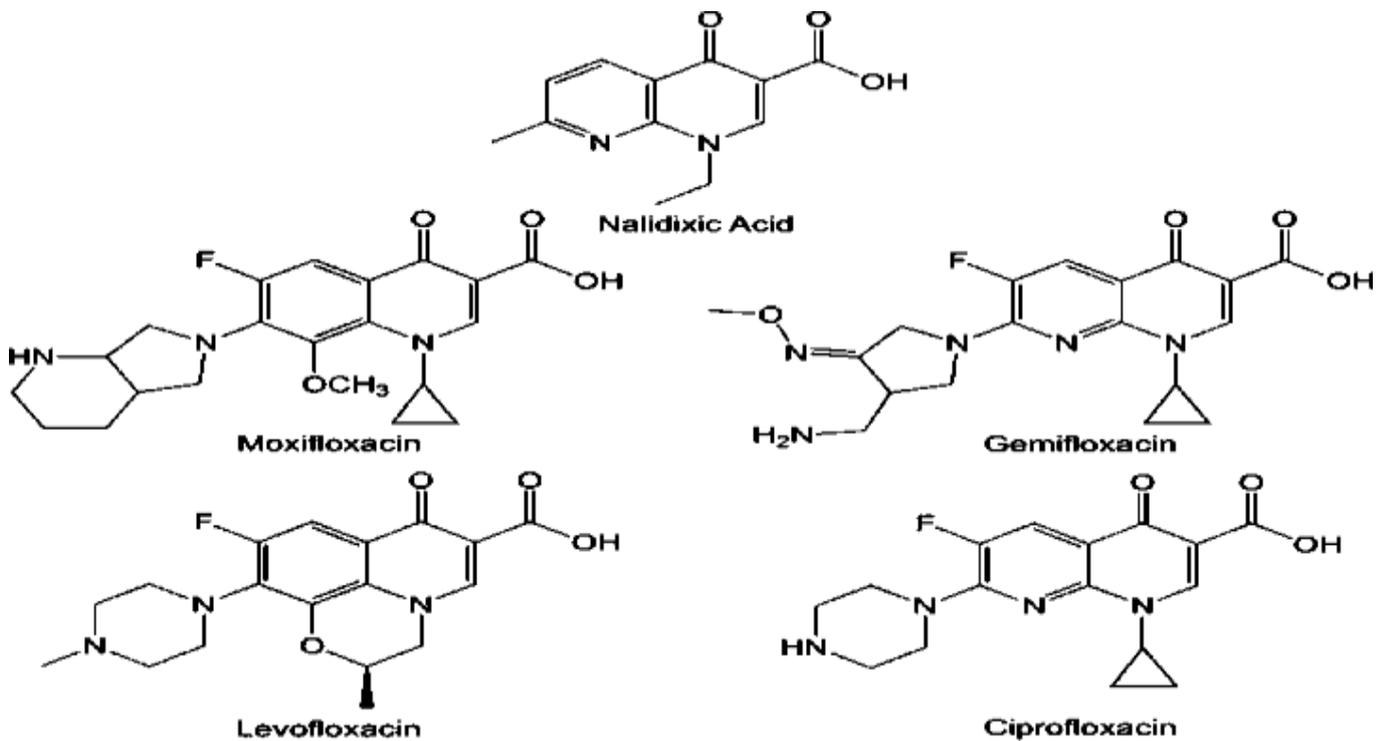


Figure 5 : Les formules chimiques des quinolones

3.1.3.1 Mécanisme d'action :

L'action antibiotique de ces produits est due à une inhibition de la réplication de l'ADN bactérien par blocage de l'ADN gyrase. Des concentrations élevées de quinolones inhibent par ailleurs la synthèse des acides ribonucléiques.

3.1.3.2 Classification des quinolones :

Cette famille comporte quatre générations :

- Première génération qui est active sur quelques bactéries à Gram négatif, dont le chef de file est l'acide nalidixique, la cinoxacine, l'acide pipémidique, l'acide oxolinique et la fluméquine.
- Deuxième génération elle a une bonne diffusion tissulaire comprend : norfloxacin, ciprofloxacine, ofloxacine, loméfloxacine, péfloxacine, énoxacin.
- Troisième génération : évofloxacine isomère de l'ofloxacine, moxifloxacine il est parfois considéré comme de 4ème génération, sparfloxacine, pazufloxacine, balofloxacine, tosufloxacine.
- Quatrième génération c'est la classe la plus récente, elle contient : trovafloxacine, moxifloxacine, gémifloxacine, sitafloxacine, clinafloxacine.

3.1.2.4. Mécanisme de résistance

La résistance acquise des bactéries aux quinolones est due dans la grande majorité des cas à une modification de l'ADN gyrase. Plus rarement, elle résulte d'une diminution de la perméabilité de la membrane externe et dans cette éventualité, la pénétration d'antibiotiques appartenant à d'autres familles est également perturbée. Ces deux mécanismes de résistance sont la conséquence de mutations de gènes chromosomiques. Les anciennes quinolones : acide nalidixique, acide piromidique, cinoxacin, acide oxolinique, acide pipémidique, fluméquine ; Les nouvelles quinolones : péfloxacine, énoxacin, ofloxacine, ciprofloxacine, loméfloxacine, grépafloracine, sparfloxacine, rosoxacin, trovafloxacine, lévofloxacine, etc.

Ciprofloxacine : Spectre d'activité Elle est active sur les Enterobacteriaceae, les Haemophilus, les Pseudomonas, les Acinetobacter, les cocci à Gram négatif (*Neisseria*), les staphylocoques et les mycobactéries.

3.1.4. Les aminosides :

Les aminosides-aminocyclitol sont constitués d'un ou plusieurs (habituellement deux) cycles glycosidiques liés à la streptomine ou la désoxystreptomine. La streptomine est l'aminocyclitol constitutif de la streptomycine et de la dihydrostreptomycine, premiers aminosides utilisés en thérapeutique. La désoxystreptomine peut être substituée en position 4 et 6 (groupe des 4, 6 di-O- glycosyles) ou en position 4 et 5 (groupe des 4, 5 di-O glycosyles). Le premier groupe

comprend la plupart des aminosides d'origine bactérienne : kanamycine, amikacine, gentamicine, tobramycine, dibékacine, sisomicine et nétilmicine.

- NB : La nature des différents substituants portés sur les deux cycles glycosidiques et sur le noyau déoxystreptamine individualise ces différents produits. La spectinomycine présente une structure particulière par rapport à celle des autres aminosides.

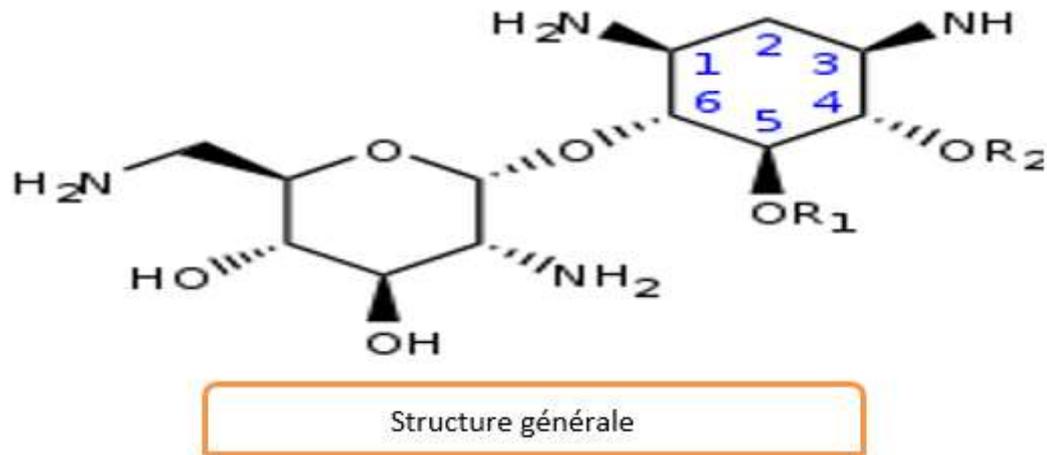


Figure 6 : Structure chimique générale des aminosides.

3.1.4.1. Mécanisme d'action :

Le mode d'action des aminosides consiste en une inhibition de la synthèse protéique des bactéries. La streptomycine se fixe sur l'ARN 16 S de la sous-unité ribosomiale 30S. Les autres aminosides exercent des interactions sur de multiples sites ribosomiaux, certains se fixant à la fois sur les deux sous-unités ribosomiales. Alors que la streptomycine bloque la synthèse protéique principalement au stade de l'initiation, les autres aminosides agissent surtout à l'étape plus tardive de translocation.

3.1.4.2. Mécanisme de résistance :

Le mécanisme de résistance bactérienne chez les aminosides, est une forme de résistance acquise le plus fréquent. A la différence des bêta-lactamases qui ont un site unique d'action, c'est - à - dire le noyau bêta-lactame, les enzymes qui modifient les aminosides ont plusieurs cibles possibles :

Les différents groupements hydroxyles, qui peuvent subir une réaction de phosphorylation ou d'adénylation sous l'action d'O- phosphotransférases ou d'O- acétyltransférases ;

Les groupements aminés qui peuvent être acétylés par des N-acétyltransférases.

L'enzyme ne détruit pas son substrat mais le modifie de telle façon que son transport à travers la membrane cytoplasmique est inhibé : l'aminoside modifié ne peut atteindre sa cible, le ribosome. La synthèse de ces enzymes est constitutive, c'est-à-dire non induite par la

présence de l'antibiotique et plusieurs types d'enzymes peuvent coexister dans une même souche bactérienne. Elles sont largement répandues dans le monde bactérien et leur nature varie selon les espèces bactériennes. Leur synthèse est gouvernée par des gènes plasmidiques ou transposables. Par ailleurs, les bactéries peuvent résister à l'action des aminosides par suite d'une modification de la cible (protéines ou ARN ribosomiaux) ou d'une diminution de l'incorporation de l'antibiotique. Ce type de résistance, qui est beaucoup plus rare en clinique que le premier évoqué, résulte des mutations chromosomiques.

3.1.4.3. Classification des 4,6-di-O-glycosyles :

- Gentamicine :

Elle a été isolée en 1963 de *Micromonospora purpurea*. Spectre d'activité La Gentamicine est active sur les staphylocoques méticillino-sensibles, les bacilles à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*), *Listeria*.

- Amikacine :

L'amikacine est une molécule obtenue par semi-synthèse à partir de la kanamycine en y adjoignant une chaîne d'acide amino-alpha-hydroxybutyrique. Spectre d'activité Il est limité aux staphylocoques méticillino-sensibles, aux bacilles à gram négatif (*Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*)

- Nétilmicine

Dérivée d'hémisynthèse, la Nétilmicine est obtenue à partir de la sisomycine par alkylation du groupe aminé en 3. Spectre d'activité Elle a le même spectre avec un pourcentage de résistance compris entre celui de la Tobramycine et de l'amikacine.

- Tobramycine :

La Tobramycine est un aminoside dérivé de *Streptomyces tenebrarius*. Spectre d'activité Le spectre d'action de la Tobramycine est similaire à celui de la Gentamicine. *Pseudomonas aeruginosa* est plus sensible à la Tobramycine qu'à la Gentamicine.

- La Kanamycine :

La Kanamycine a été isolée de *Streptomyces kanamyceticus* en 1957. Spectre d'activité Très étendu pour les bacilles et coques à Gram négatif, le spectre est nettement plus étroit dans le domaine des coques à Gram positif, en effet seuls les Staphylocoques sont sensibles. La Kanamycine agit aussi sur *Mycobacterium tuberculosis*. Les anaérobies sont naturellement résistants à la kanamycine, de même que *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. Les bacilles à Gram négatif non fermentaires

Les bacilles Gram négatif non fermentaires sont ubiquitaires. Ils sont isolés de l'environnement (eaux douces et de mer, sol, végétaux, poussières en suspension dans l'air), dans les effluents et sont également retrouvés au niveau du tractus digestif des animaux. Ces bactéries ayant peu d'exigences nutritives survivent et se multiplient dans les milieux humides, notamment dans l'environnement hospitalier (robinet, évier, siphon, vase), et peuvent aussi contaminer des solutions antiseptiques. Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales d'origine exogène (infections manuportées, infections sur matériel implanté) et d'origine endogène (flore cutanée, digestive) chez des patients le plus souvent immunodéprimés. Elles sont dites pathogènes opportunistes car, bien que pouvant être isolées d'infections communautaires. Outre la famille des *Pseudomonadaceae*, les BGNnF comportent aussi *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium* et *Sphingobacterium*. Au sein des *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, sont les bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales(13).

Ces bactéries caractérisées par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, et pouvant acquérir de nombreux autres mécanismes de résistance.

3.2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, (couleur vert-de-gris) ou bacille pyocyanique est Découvert par Gessard en 1882. Au cours de la 1ère guerre mondiale, l'agent du "pus blé est à l'origine de la surinfection de plaies chez les soldats. Mais c'est surtout dans les années 1960-70, parallèlement au développement de l'hospitalisation et des techniques invasives d'exploration, que cette bactérie à Gram négatif émerge comme un agent pathogène majeur de l'Homme. C'est l'exemple de type des bactéries nosocomiales opportunistes. La dernière enquête de prévalence des infections associées aux soins organisée par Santé publique France en 2012, la classe au 3^{ème} rang(8,4%) des espèces nosocomiales, derrière E. coli (26,0%) et S. aureus (15,9%). Elle est une cause majeure d'infections pulmonaires nosocomiales (18,1%), notamment dans les services de réanimation(14).

- **Classification** : Selon la 9^{ème} édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (1994),

P. aeruginosa est classé comme suit :

Tableau I: Classification taxonomique de *Pseudomonas aeruginosa*

Domaine	Bacteria
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

3.2.2. Habitat :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensal sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de divers animaux(15).

3.2.3. Caractères bactériologiques :

P. aeruginosae est un bacille à Gram négatif ubiquitaire, présent notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques, non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (Figure 7). Bien que ce pathogène aérobic strict ait un métabolisme oxydatif, non fermentaire, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobic. *P. aeruginosa* est une bactérie mobile grâce à la présence d'un flagelle polaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive. Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. *P. aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. La morphologie de *P. aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinguée grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique.

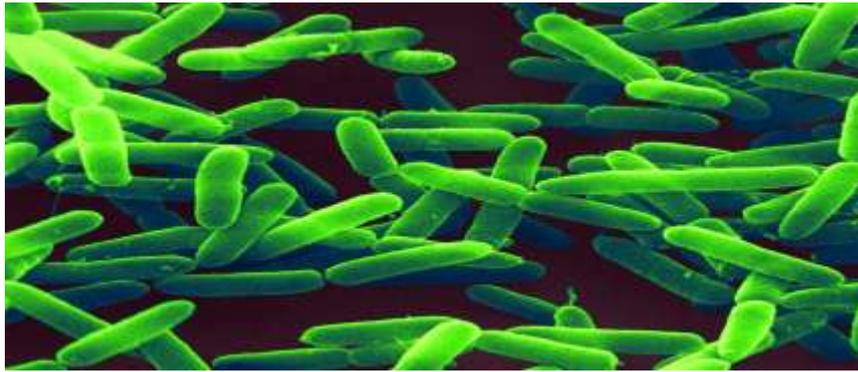


Figure 7 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique(16).

3.2.4. Caractères cultureux :

P. aeruginosa pousse facilement sur milieux ordinaires en développant une odeur de seringas. La température optimale de croissance est de 30 °C. Pour les souches pigmentées (95 %), les milieux de King A et King B permettent une identification de *P. aeruginosa* par la mise en évidence de la production de deux pigments : la pyocyanine (hydrosoluble) et la pyoverdine (soluble dans le chloroforme), respectivement. D'autres pigments hydrosolubles peuvent être produits parfois de manière transitoire : la pyomélanine brune et la pyorubrine rouge. À partir de prélèvements polymicrobiens, il est nécessaire d'avoir recours à un milieu sélectif contenant du cétrimide(ammonium quaternaire) associé ou non à de l'acide nalidixique(14).



Figure 8: Vue d'une boîte de pétrie de Colonies non pigmentées de *P. aeruginosa*



Figure 9 : Vue d'une boîte de pétrie de pigmentées de *P. aeruginosa*

3.2.5. Marqueurs épidémiologiques :

Quand plusieurs infections dues à une même espèce bactérienne surviennent dans un service hospitalier, il faut vérifier s'il s'agit d'une épidémie ; dans ce cas la même souche est à l'origine de toutes les infections et toutes les bactéries isolées possèdent les mêmes caractéristiques. Certains éléments phénotypiques, suffisamment discriminant, peuvent dans ce but, être utilisés comme « marqueurs épidémiologiques ». En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa*, les méthodes phénotypiques disponibles sont :

- La sérotypie des Ag O et l'antibiotypie utilisées lors d'une première approche. La sérotypie est une réaction d'agglutination sur lame réalisée à partir de colonies prélevées sur gélose qui individualise 16 sérotypes avec le kit le plus utilisé (Biorad). Il existe des réactions croisées entre sérogroupes (souche polyagglutinable) et 10 % des souches sont non agglutinables (souches muqueuses notamment).

-L'antibiotypie est un marqueur peu discriminant, surtout pour différencier des souches impliquées dans des pathologies chroniques chez des patients soumis à des antibiothérapies répétées qui peuvent avoir une influence sur les résultats de l'antibiogramme. Les méthodes génotypiques font appel à des techniques développées dans le chapitre concernant la biologie moléculaire à des fins diagnostiques et épidémiologiques. La méthode de référence est l'électrophorèse en champs pulsés. Cependant, cette méthode lourde à mettre en œuvre est souvent précédée par des méthodes utilisant la PCR (par exemple RAPD, ERIC-PCR, rep-PCR, PCR-ribotypie, MLVA et MLST).

3.2.6. Caractères biochimiques :

Pseudomonas aeruginosa n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux MEVAG (Milieu pour Etude de la voie Attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson sont spécialement destinés à mettre cette propriété en évidence. *Pseudomonas aeruginosa* possède une oxydase. *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'utiliser de nombreux substrats carbonés comme seule source de carbone et d'énergie : glucose, acide lactique, acide acétique, arginine, citrate, malonate..... La réalisation d'un test d'assimilation des substrats carbonés ou auxanogramme est utile pour reconnaître l'espèce et différencier les biotypes...

3.2.7. Transmission :

Elle peut se faire à partir des sources environnementales, soit directement, soit par l'intermédiaire de matériels lavés ou rincés à l'eau du réseau. Elle peut aussi être

interhumaine à partir d'un sujet colonisé. La pression de sélection des antibiotiques en milieu hospitalier augmente probablement le risque de colonisation(17).

3.2.8. Pouvoir pathogène :

La bactérie n'est pas pathogène pour le sujet normal, mais elle peut provoquer des infections parfois sévères chez les sujets dont les défenses sont amoindries. Elle peut provoquer des infections urinaires, bronchiques (en particulier chez les sujets atteints de mucoviscidose), pulmonaires (chez les immunodéprimés ou les malades ventilés), oculaires (kératite ou endophtalmie), ostéoarticulaires. Elle peut aussi surinfecter des lésions cutanées (brûlures), des plaies traumatiques ou postopératoires, provoquer des otites externes (pouvant évoluer de manière invasive chez les sujets âgés et diabétiques), des septicémies (en particulier chez les neutropéniques), des endocardites (chez les toxicomanes).

3.2.9. Facteurs de pathogénicité :

P. aeruginosa possède des fimbriae qui permettent l'adhésion aux muqueuses. Les souches qui colonisent les bronches des enfants atteints de mucoviscidose sont entourées d'une pseudo-capsule polysaccharidique qui donne un aspect muqueux aux colonies bactériennes. Ce constituant augmente l'adhésion de la bactérie et exerce une action anti phagocytaire. La bactérie produit plusieurs toxines cytotoxiques : deux hémolysines et l'exotoxine A dont le mode d'action est similaire à celui de la toxine diphtérique.

3.2.10. Antibiorésistance

P. aeruginosa est caractérisée par une résistance naturelle à de nombreuses familles d'antibiotiques et par son aptitude à l'acquisition de nouvelles résistances vis-à-vis de composés habituellement actifs(18).

- Résistance naturelle :

P. aeruginosa possède une membrane externe faiblement perméable, ce qui lui confère une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques, dont la plupart des β -lactamines hydrophyles. Cette résistance naturelle résulte principalement de l'intervention d'autres mécanismes comme la production d'une céphalosporinase chromosomique et l'existence d'un système d'efflux(19).

Les résistances acquises

Elles sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe (modification des porines) ou à la production d'enzyme inactivant. Ces deux mécanismes peuvent coexister et conjuguer leurs effets.

Résistance acquise aux β -lactamines

Résistance enzymatique :

- **Acquisition de pénicillinases plasmidiques** : Ces pénicillinases confèrent une résistance aux carboxypénicillines, aux uréidopénicillines et à la cefsulodine mais la sensibilité à la ceftazidime, l'aztréonam et l'imipénème est conservée. Il existe un risque d'induction de céphalosporinase (réversible) avec les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique)(20).

- **Hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC par mutation d'un gène de régulation** : « **céphalosporinase déréprimée** » : Les souches, ainsi modifiées, deviennent résistantes à toutes les bêta-lactamines sauf les amidinopénicillines (mécillnam, pivmécillnam) et les carbapénèmes. La mutation peut survenir inopinément au cours d'un traitement et entraîner des échecs thérapeutiques. Il existe différents niveaux de dérégulation de la céphalosporinase (la plupart des souches ne sont que partiellement dérégulées), et le niveau de résistance est proportionnel à la quantité d'enzyme produite. Ce mécanisme ne doit pas être confondu avec l'induction d'une céphalosporinase par les inhibiteurs de β -lactamases chez des souches sauvages, qui rendent alors l'association (inhibiteur de β -lactamases + céphalosporine) antagoniste.(21)

- **Acquisition d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE)** : Ce sont des enzymes plasmidiques qui hydrolysent toutes les bêta-lactamines sauf les carbapénèmes. L'activité des β -lactamines restaurée théoriquement par les inhibiteurs de β -lactamases. Elles sont très rarement rapportées chez *P. aeruginosa* (contrairement à *Klebsiella*).

- **Carbapénémases** : Ce sont des métalloprotéines chromosomiques ou plasmidiques conférant une résistance aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam, ainsi qu'un bas niveau de résistance à l'imipénème. Les carbapénémases sont redoutables car elles induisent une résistance de haut niveau à toutes les bêta-lactamines. La sensibilité à la pipéracilline et à l'aztréonam est conservée. En cas d'association de ce mécanisme à un mécanisme d'imperméabilité, on obtient un haut niveau de résistance à l'imipénème. La détection des carbapénémases par les techniques bactériologiques de routine n'est pas aisée, ce qui augmente les difficultés de surveillance épidémiologique(19).

- Résistance non enzymatique :

- **Acquisition par mutations de systèmes d'efflux actif** : Les mutations aboutissent à la surproduction des pompes transmembranaires permettant d'expulser l'antibiotique hors de la bactérie, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique. Le niveau de résistance est moindre que chez les souches productrices de β -lactamases. Certaines souches ne sont résistantes qu'à la ticarcilline, cette résistance n'étant pas restaurée par les inhibiteurs de β -lactamases. La plupart des souches restent sensibles à la pipéracilline et à la

ceftazidime. Parmi les carbapénèmes, seul le méropénème peut être affecté par un mécanisme d'efflux.

- **Mutation de la porine D2 (mutants oprD):** La porine sert comme un canal d'entrée de l'imipénème. L'association d'une hydrolyse partielle par la céphalosporinase chromosomique et la mutation de la porine induisent une résistance sélective à l'imipénème. La sensibilité au méropénème est conservée.

Phénotypes de résistances : Les principaux phénotypes de résistance aux Bétalactamines de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*(22)

Tableau II: Récapitulatif des phénotypes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bétalactamines.

Phénotype de résistance	TIC	PIP	CFP	CFS	CAZ	ATM	CPI	IPM
Pénicillinase	R	R	R	R	S	S	S	S
Céphalosporinase hyperproduite "modérées"	R	R	R	R	R	R	S	S
Céphalosporinase hyperproduite haut niveau	R	R	R	R	R	R	R	S
Imperméabilité	R	V	V		S	S	S	S
Porine D2	S	S	S	S	S	S	S	R

TIC = ticarcilline ; PIP = pipéracilline ; CFP = céfopérazone; CFS = cefsulodine ; CAZ = ceftazidime ; ATM= aztréonam ; IPM = imipénème ; CPI = céfépime ; R = résistant ; S = sensible ; V = sensibilité variable, incluant la possibilité d'une sensibilité diminuée. Les phénotypes de résistance aux béta-lactamines rapportés au tableau II sont les suivants

- **Phénotype sauvage** : Les souches de phénotype sauvage sont résistantes aux aminopénicillines, aux céphalosporines de 1ère et 2ème génération, mais sensibles aux carboxypénicillines, aux uréidopénicillines, à la ceftazidime, à la cefsulodine, la céfopérazone, à l'aztréonam, au latamoxef, au céfépime et à l'imipénème
- **Phénotype "pénicillinase** : Il est lié à la production de béta-lactamase de type PSE, TEM ou OXA. Les souches de phénotype « pénicillinase » sont résistantes aux

carboxypénicillines, aux uréidopénicillines, à la céfopérazone et à la cefsulodine. Elles sont sensibles au latamoxef, à l'aztréonam, la ceftazidime, l'imipénème et au céfépime.

- **Phénotypes céphalosporinase hyperproduite** : La production de cette enzyme est inductible ou résulte d'une dérégulation stable consécutive à une mutation. L'apparition récente de céphalosporines de 3^e génération est beaucoup plus stable aux céphalosporinases tel le céfépime, oblige à différencier deux phénotypes :
 - **"céphalosporinase hyperproduite" modérément** : résistance à toutes les bêtalactamines, sauf au céfépime et à l'imipénème ;
 - **"céphalosporinase hyperproduite" à très haut niveau** : résistance à toutes les bêtalactamines sauf à l'imipénème. Phénotype "impermeabilité" : Les souches du phénotype "impermeabilité" sont résistantes aux carboxypénicillines, mais de sensibilité variable aux uréidopénicillines à la cefsulodine et à la céfopérazone. La ceftazidime, le céfépime et l'aztréonam sont souvent actifs. L'activité de l'imipénème est constante.
- **Phénotype "mutant de porine D2"** : Ce phénotype est caractérisé par une résistance isolée à l'imipénème. En ce qui concerne les fluoroquinolones, il faut retenir que les souches sensibles ou intermédiaires à la péfloxacin, la norfloxacin ou l'ofloxacin sont sensibles à la ciprofloxacine(23).

Les principaux phénotypes de résistance aux Aminocyclitolés de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*

- **Phénotype sauvage ou sensible** :

Il s'agit de souches sensibles à tous les aminocyclitolés testés à l'exception de la kanamycine (*Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* ont une résistance naturelle à la kanamycine).
- **Phénotype G** :

Ce sont des souches résistantes à la gentamicine, mais sensibles aux autres aminocyclitolés.
- **Phénotype N** :

Ce sont des souches résistantes à la nétilmicine, mais sensibles aux autres aminocyclitolés.
- **Phénotype GT** :

Il s'agit de souches résistantes à la gentamicine et à la Tobramycine, mais sensibles aux autres aminocyclitolés.
- **Phénotype GN** :

Ce sont des souches résistantes à la gentamicine la nétilmicine, mais sensibles aux autres aminocyclitolés.

➤ **Phénotype GTN :**

Ce phénotype correspond aux souches sensibles à l'amikacine et résistantes aux autres aminosides.

➤ **Phénotype GNA :**

Ce phénotype correspond aux souches sensibles à la Tobramicyne et résistantes aux autres aminosides.

➤ **Phénotype GTNA :**

Il s'agit de souches résistantes à tous les aminosides testés. Les souches GTNA sont résistantes à l'isépamicine. Ce phénotype est le fait d'une imperméabilité ou l'association d'une imperméabilité à une acétylation.

Tableau III: Les principaux phénotypes de résistance possible aux fluoroquinolones pour *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*

Phénotypes	Norfloxacin	Péfloxacin	Ofloxacin/ Levofloxacin	Ciprofloxacin
I Sauvage	S	S	S	S
II	I	I	I	S
III	R	R	R	S
IV	R	R	R	R
Efflux	R	S	S	R

Ciprofloxacin : R, mutation de la cible ou imperméabilité

3.3. *Acinetobacter baumannii* :

Acinetobacter baumannii est un coccobacille à gram négatif. Il est essentiellement à l'origine de pneumopathies ou de bactériémies et touche principalement les patients présentant un terrain fragilisé, ayant des dispositifs invasifs et ayant reçu une antibiothérapie.

Il est fréquemment responsable d'épidémies en milieu hospitalier, et notamment dans les services de réanimation, en raison de sa capacité de survie prolongée sur des surfaces inertes et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques(24).

- **Classification** : *Acinetobacter baumannii* a été classée comme suite en 1986 par Bouvet et Grimon

Tableau IV : Classification taxonomique d'*Acinetobacter baumannii*

Domaine	Bacteria
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Moraxellaceae</i>
Genre	<i>Acinetobacter</i>
Espèce	<i>Baumannii</i>

3.3.1. Habitat :

Acinetobacter baumannii est considéré comme une bactérie ubiquitaire ayant pour principal habitat le sol, les eaux, les végétaux, et des animaux(25). Chez l'homme, elle peut coloniser la peau, les plaies et les tractus aériens et digestifs, elle peut résister à la dessiccation pendant plusieurs semaines(26).

3.3.2. Caractères bactériologiques :

- Morphologie Coloration :

Bacilles à Gram négatif, immobiles, non sporulés, parfois Capsulés, trapus, souvent associés en paire ou en courtes chaînes ; formes filamenteuses dans les cultures âgées.

- Caractères culturels :

Aérobie strict, cultive facilement sur milieux usuels. *Acinetobacter baumannii* est la seule espèce cultivé à 44°

-Caractères d'identification :

Le diagnostic du genre est aisé : bacilles à gram-, aérobies stricts, oxydase-, catalase + L'identification biochimique des diverses espèces est difficile,

A. baumannii, *A. calcoaceticus*, et *Acinetobacter genomospecies* 3 et 13 sont très difficiles à distinguer par leurs caractères phénotypiques. Le diagnostic différentiel entre ces 4 taxons repose sur des tests d'assimilation(27).

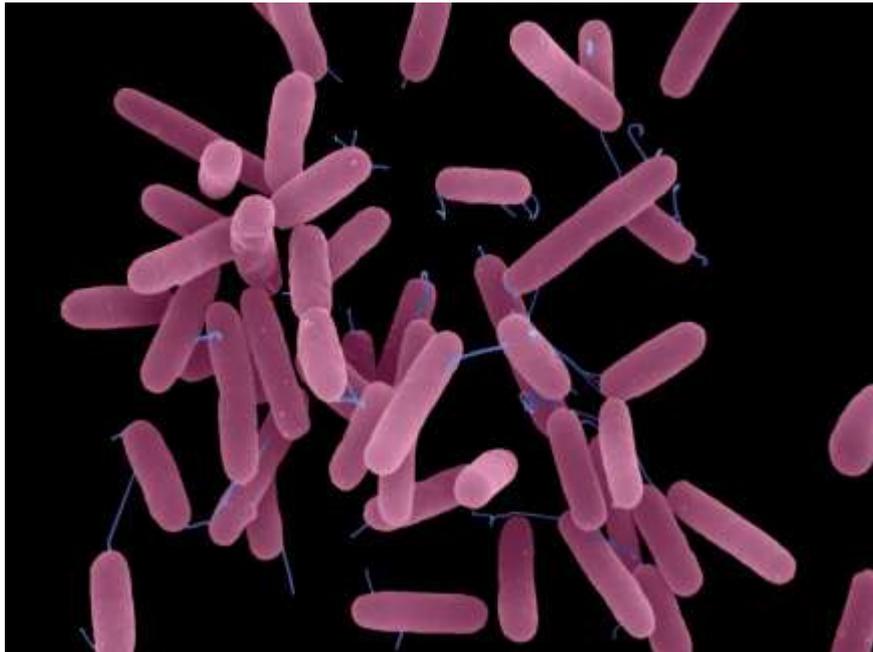


Figure 10: *Acinetobacter baumannii* vue au microscope électronique vue du net.

3.3.3. Caractères cultureux :

Acinetobacter cultive sur les milieux non sélectifs habituels (gélose trypticase soja), à une température de 30-37°C, (*A. baumannii* se développe à 44°C, contrairement à *A. calcoaceticus*). Leur isolement est possible sur les milieux sélectifs des bactéries Gram négatives (SS, Hektoen, Drygalski, Mac Conkey...). Un pH compris entre 5,5 et 6 favorise leur croissance(28).



Figure 11: Colonies d'*A.baumannii* Vues sur une gélose en boîte de pétries.

Mécanisme de résistance aux β -lactamines chez *Acinetobacter baumannii* :

Résistance naturelle :

Les souches de *Acinetobacter baumannii* produisent une bêta-lactamase chromosomique de classe C, qui n'est pas inhibée par le clavulanate, qui hydrolyse préférentiellement les

céphalosporines de première génération mais n'a pas d'activité pour les pénicillines et la Pipéracilline.

3.3.4. Résistance acquise

3.3.4.1. Résistance enzymatiques

- Céphalosporinase de classe C Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii*(29). liés principalement à la production de β -lactamases. *Acinetobacter baumannii* produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céphalotine) ou des carbapénems. L'insertion d'une séquence spécifique ISAbal en amont du gène bla ampC favorise l'expression de cette β -lactamase de type AmpC en fournissant des séquences promoteur ce qui entraîne la résistance à la Ceftazidime(30).
- Oxacillinase de classe D Les oxacillinases en général hydrolysent l'oxacilline, la méthicilline, cloxacilline et la benzylpénicilline, et leur activité est inhibée par NaCl de plus, elles sont faiblement inhibées par l'acide clavulanique. La plupart des β lactamases de type OXA n'hydrolysent pas de façon significative les C3G/C4G mais l'évolution par mutation(s) ponctuelle(s) vers un élargissement du spectre a dû avoir lieu comme pour les dérivés de TEM/SHV(31). *A. baumannii* produit une bêta-lactamase de classe D qui est l'oxacillinase représentée par le cluster d'enzyme OXA-51/OXA-69(Gerischer, 2008), les β -lactamases de type OXA-51/69 pourrait contribuer à la résistance aux carbapénems par l'insertion d'IS Abal dans la région promotrice du gène bla OXA-51/69(32).
- Des oxacillinases aux propriétés de carbapénémases sont identifiés chez *A. baumannii*, ces oxacillinases sont de trois grands types : OXA-23, OXA-24/OXA-40 et OXA-58. Elles confèrent des degrés variables d'hydrolyse des carbapénèmes dépendant de leur niveau d'expression.
- Métallo- β -lactamases de classe B Les β -lactamases de classe B ont besoin d'un atome de zinc pour détruire les β lactamines(33). elles sont inhibées par l'EDTA(34). Trois groupes ont été identifiés chez *A.baumannii* (IMP-like, VIM-like et SIM-1 , cette classe d'enzyme hydrolyse tous les β lactamines à l'exception des monobactames(35).
- β -actamases à spectre élargi chez *A. baumannii* les BLSE sont soit chromosomiques ou plasmidiques.(46) Les enzymes du type GES et PER, VEB et IBC-2, ont été largement retrouvées chez *A.baumannii*, Les enzymes du type VEB hydrolysent de préférence la ceftazidime et l'aztréonam, les gènes correspondant à ces BLSE sont le plus souvent retrouvés

dans des structures de type intégron comme gènes cassettes (VEB-1, IBC-1, GES-1, GES-3) et donc sous la dépendance de promoteurs situés à l'extrémité 3' du gène de l'intégrase(36).

3.3.4.2. Résistance non enzymatiques

- Surexpression du système d'efflux Les pompes à efflux illustrent un phénomène unique dans la résistance aux médicaments: un seul mécanisme provoquant la résistance contre les différentes classes d'antibiotiques. *A. baumannii* possède une pompe à efflux A de ABC dont les substrats sont : Aminoglycosides, les tétracyclines, l'érythromycine, au chloramphénicol, triméthoprim, fluoroquinolones, des bêta-lactamines, et encore récemment, la tigécycline(37).

- Modification de l'expression des PLP L'efficacité des bêta-lactamines est liée à leur capacité de se fixer aux PLP. La liaison antibiotique / cible est liée à la structure de la cible. Diverses mutations peuvent entraîner des modifications diminuant l'efficacité de l'antibiotique(38).

3.3.4.3. Résistance aux aminosides :

La résistance de *A. baumannii* aux aminosides résulte principalement de l'inactivation de l'antibiotique par certains enzymes de modification, on a décrit depuis 1988 la production d'enzymes : APH (3')-I, APH (6), AAC (3)-I, ANT (2'')-I et APH (3')-IV(39).

A.baumanii possède une pompe à efflux de type Ade ABC qui confère la résistance à diverses classes d'antibiotiques y compris les aminosides, elle est composée de protéines A de A, A de B et A de C(40).

3.4. *Chryseomonas lutéola*:

3 .4.1 Caractéristiques :

Les bactéries appartenant au genre *Chryseomonas* sont des cellules non sporulées, Gram négative, en forme de bâtonnets aux extrémités arrondies. Elles se présentent souvent seules, rarement par paire et sont mobiles grâce à leur multiples flagelles en position polaire. Il n'y a pas de granules intracellulaires de poly- β -hydroxybutyrate. Leur métabolisme est strictement aérobie. Les colonies se développent entre 18 et 42°C. La croissance sur des supports solides donne des colonies pâles à jaune foncé. Celles-ci sont typiquement rondes avec un diamètre de 1 mm, faiblement convexes, lisses et brillants, sur toute leur longueur. Elles sont catalases positives et oxydase négatives, elles sont chimio-organotrophes et lysent le saccharose de manière oxydative. Le contenu de l'ADN en bases G+C est de 54 à 56 %. Elles semblent être saprobies ou commensales des humains et des animaux à sang chaud, chez lesquelles elles peuvent devenir pathogènes(41).

3.4.2 Isolement et identification conventionnelle

L'isolement et les repiquages sont réalisés sur des milieux ordinaires type gélose nutritive, gélose trypticase soja ou gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) incubés à des températures comprises entre 25 et 35°C. A partir d'un prélèvement multibactérien, des milieux sélectifs peuvent être utilisés afin d'isoler de manière sélective certains germes. La gestion de la température d'incubation permettra également une sélection de la pousse de certains germes. Une incubation à 41°C par exemple, entraînera une culture sélective de *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres *Pseudomonas* sont capables de se développer à cette température : *P. alcaligenes*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*. L'aspect des colonies (lisse, fripé...) va dans un premier temps nous orienter vers certains germes, la production de pigment est également un critère d'identification important. On pensera que l'on est en présence d'un germe du genre *Pseudomonas* lorsque, les bactéries présentes sur l'isolement sont mobiles, Gram négative, aérobies strictes et se développant sur des milieux usuels avec parfois production d'un pigment voire d'une odeur caractéristique. Les caractéristiques biochimiques permettent également l'identification des germes. Des kits existent, permettant de faciliter l'identification des germes : la galerie API 20NE (BioMérieux) par exemple, est un système qui combine 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation que l'on mettra à incuber 24 à 48 h à 30°C. Ce kit permet une identification précise de la plupart des espèces appartenant au groupe des *Pseudomonas* « non fermentantes », à l'exception de certaines, qui possèdent plusieurs biovars et donc des caractéristiques différentes(41).

3.5. *Burkholderia cepacia* :

L'espèce comme nouveau nom *Burkholderia cepacia* a été décrite pour la première fois en 1950 par *Burkholder* sous la dénomination de *Pseudomonas cepacia* comme une bactérie phytopatogène (oignon, riz). C'est un bacille assez fin, mobile grâce à une ciliature polaire multitriche, cultivant à une température optimale de 30°C à 35°C et capable d'assimiler un grand nombre de substrats. Sur gélose au sang, les colonies sont opaques, brillantes et convexes.

Par rapport à *P.aeruginosa*, *B.cepacia* produit peu de facteurs virulents dont certains sont décrits : hémolysines, protéases, exopolysaccharides, lipases et sidérophores(42).

La bactérie occupe diverses niches écologiques (sols, l'eau, animaux, les plantes et les humains), possède la faculté de survie dans l'environnement hospitalier. C'est un pathogène opportuniste fréquemment retrouvé comme agent colonisant ou infectant la voie respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, il possède une résistance à de nombreux antibiotiques et désinfectants tel que polyvidone iodée et Chlorhexidine.

3.5.1. Identification :

L'identification à l'aide des galeries biochimiques donne des résultats variables en fonction des genres et espèces considérés : satisfaisants pour certains genres, médiocres pour d'autres (complexe *Burkholderia cepacia* par exemple).

3.5.2. Caractères cultureux

B. cepacia cultive sur milieux ordinaires à 30 °C en 48 heures. L'utilisation de milieux sélectifs à partir des expectorations non diluées chez les patients atteints de mucoviscidose est nécessaire. Le milieu BSCA rendu sélectif par la présence de gentamicine et de polymyxine permet une croissance plus rapide de *B. cepacia*, mais ne permet pas la croissance de *B. gladioli* (sensible à la gentamicine), contrairement au milieu OFPBL contenant de la polymyxine et de la bacitracine.



Figure 12: Colonies de *B. cepacia* sur gélose de sang

- Résistance aux antibiotiques

B. cepacia est caractérisé par une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques dont les carboxypénicillines, les aminosides et la colistine (**Le Bourgeois et al. 2005**) La pipéracilline, la ceftazidime, le méropénème (contrairement à l'imipénème), et la témocilline sont les molécules les plus actives (**Segonds et al. 2006**).

- Système d'efflux

Burkholderia cepacia présente un haut niveau de résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones). Ceci est 37 partiellement dû à la présence de différentes pompes MDR comme SmeABC, CeoABOpcM, AmrAB-OprA ou BpeAB-OprB (**Cattoir, 2004**).

- **Imperméabilité**

Burkholderia cepacia est le plus souvent multirésistant aux antibiotiques. Les mécanismes impliqués sont essentiellement l'imperméabilité (résistance naturelle aux antibiotiques polycationiques : aminoglycosides, polypeptides, dont le passage à travers la membrane externe nécessite la présence de récepteurs anioniques au niveau du LPS, récepteurs qui sont très peu nombreux chez *B. cepacia*, imperméabilité à l'imipénème) (**Segonds et al. 2001**)

β -lactamase de classe A (PenA)

La résistance du complexe *B. cepacia* a été liée à une β -lactamase chromosomique inductible qui a été faussement identifiée comme une enzyme de type AmpC. Puis, Trépanier et al a décrit une β -lactamase de classe A (Pen A). Pen A possède un profil à spectre étroit, et elle est régulée par un régulateur transcriptionnel de type Lyse R, PenR. Cette régulation négative est responsable de l'expression inductible de Pen A (**Nordmann et al. 2009**).

METHODOLOGIE

4- Méthodologie

4.1. Cadre d'étude

Notre étude a été réalisée au laboratoire d'analyses biomédicales BIOTECH du Forum Médical de Bamako.

C'est une structure spécialisée qui reçoit en grande partie les demandes d'analyses biologiques, des échantillons provenant des milieux hospitaliers et communautaires ayant une activité élevée de réalisation des examens bactériologiques.

Le volume des analyses par an au laboratoire s'élève à 45 288.

Il est composé de l'unité de:

- Bactériologie
- Parasitologie
- Hématologie
- Sérologie
- Immunologie
- Biochimie
- Anatomie pathologique.

Le personnel est composé de :

- Deux pharmaciens biologistes,
- Treize (13) techniciens de laboratoires,
- Un (1) agent d'accueil,
- Trois (3) agents comptables,
- Quatre (4) agents d'hygiène,
- Cinq (5) agents de sécurité.

4.2. Type et période d'étude

Il s'agit d'une étude transversale, prospective et descriptive, réalisée de Mars 2020 en Mars 2021 au laboratoire BIOTECH de Bamako, chez des patients hospitalisés à la clinique médicale du forum BIOTECH et communautaires provenant d'autres structures.

1.3. Population d'étude :

Notre étude a concerné les patients venus avec une demande d'examens bactériologiques au laboratoire Biotech chez qui nous avons isolé des souches bactériennes de la famille des bacilles gram- non fermentaires isolées, pendant la période de notre étude

4.3.1 Critère d'inclusion :

Ont été inclus dans notre étude tous les patients :

- se présentant avec une demande d'examen bactériologique au laboratoire BIOTECH,

- chez qui nous avons isolé des bactéries de la famille des bacilles Gram négatif non fermentaires, avec un antibiogramme réalisé pendant la période de l'étude.

4.3.2. Critère de non inclusion :

N'ont pas été inclus dans notre étude les patients chez lesquels:

- Des bactéries autres que des bacilles Gram négatif non fermentaires ont été isolées,
- La concentration du germe identifié est jugée insuffisante par vitek.2,
- L'identification de la bactérie par API 20^{NE} ne concorde pas avec celle du VITEK 2.

4.4. Variables étudiées

La collecte des données était réalisée à partir d'une fiche d'enquête préétablie sur laquelle toutes les informations sont portées.

❖ Les variables sociodémographiques

- L'âge,
- Le sexe.

❖ Les données bactériologiques

- La nature des prélèvements.
- Les bactéries identifiées,
- Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques,
- Les phénotypes de résistants.

4.5. Méthode d'étude:

5. Matériels

❖ Matériel de prélèvement :

- Ecouvillon,
- Pots stériles pour l'ECBU et les selles, les expectorations et les spermes,
- Savon liquide pour le nettoyage,
- L'eau,
- Papier toilette,
- Tubes stériles pour les exsudats génitaux,
- Spéculum à usage unique,
- Gants,
- Solution hydro-alcoolique.

❖ Matériel technique :

➤ Equipement :

- Microscope optique,
- Etuve bactériologique (SANYO),

- Automate (VITEK 2 Compact Biomérieux),
- Distillateur (EBMED),
- Bec bunsen,
- Autoclave (MASTERCLAV Biomérieux)
- Balance de précision (PAG OERLIKON AG).

➤ **Petit Matériel :**

- Anse,
- Pipette pasteur,
- Cellule de Kova,
- Lames porte-objet et lamelle,
- Bac d'eau de Javel,
- Ecouvillon,
- Tubes d'eau distillée stérile,
- Distributeurs de disques,



Figure 13: Flacon de prélèvement à usage unique pour les urines (à gauche) et pour les crachats à droit.

❖ **Les réactifs :**

Les réactifs utilisés sont :

- ✓ Réactif de coloration de GRAM (le violet de gentiane, la solution iodo-iodurée lugol l'alcool à 90°, l'eau du robinet),
- ✓ - Réactifs : Chlorure de Fer III, Réactif de Kovacs (ou James), NaOH ou KOH (VP1),
- ✓ Napht-1-ol (VP2), Acide sulfanilique, Naphtyl-1-Amine et poudre de zinc si nécessaire.
- ✓ Bandelettes urinaires,
- ✓ Milieux de culture prêts à l'emploi (Gélose Uri Select 4, Gélose Hektoen, Eosin méthylène Blue: EMB), Mueller Hunton,
- ✓ Galerie miniature API 20^{NE},
- ✓ Huile de vaseline,
- ✓ Eau distillée stérile (ou « Suspension Medium » 5 mL),
- ✓ Disques d'antibiotique,
- ✓ Galerie API 20^{NE},
- ✓ Révélateurs,
- ✓ Cartouches pour le VITEK-2,



Figure 14: Milieu de culture «Uriselect » **Figure 15:** Milieu de culture Eosine méthylène Blue

❖ **Les disques d'antibiotique testés et leurs charges :**

Tableau V: Les disques d'antibiotiques testés.

<ul style="list-style-type: none"> • Béta-lactamines Pénicillines Ampicilline : 10µg Amoxicilline + Acide clavulanique : 20+10µg Piperacilline : Pipéracilline +Tazobactam : 75+10µg Ticarcilline : 75µg Ticarcilline + Acide clavulanique : Céphalosporines Cefalotine : 30µg Cefoxitine : 30µg Cefotaxime : 30µg Ceftazidine : 30µg Cefepime : Carbapénèmes Imipenème : 10µg Méropénème : Ertapénème : 	<ul style="list-style-type: none"> • Aminosides Amikacine : 30µg Gentamicine : 10µg Tobramycine : 10µg • Fluoroquinolones Ciprofloxacine : 5µg Levofloxacine : Ofloxacine : 5µg • Autres Sulfamethoxazole+Trimethoprim : 23,75+1,25µg Nitrofurantoïne : 300µg Colistine : 10µg Fosfomycine : 50µg
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

4.5.2. Prélèvements

Le matériel biologique était constitué par les produits pathologiques. Il s'agit ;

- D'urine,
- De liquide d'épanchement,
- D'expectoration,
- Des selles et

4.6. Techniques utilisées

1. Les produits pathologiques

IL s'agit des prélèvements effectués et acheminés au laboratoire BIOTECH en fonction des différents sites d'infections et concernaient l'urine, le pus, le liquide d'ascite, d'expectoration, des selles et des prélèvements vaginaux.

1.2.1. Examen cyto bactériologique des urines (E.C.B.U.) :

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

• Prélèvement :

Le prélèvement était fait sur les premières urines du matin et le milieu du jet, recueillies dans un flacon stérile. Le flacon est remis au patient dans la salle de prélèvement ou le patient l'emmène à domicile pour faire le recueil.

Après prescription, le personnel sanitaire explique au patient le mode de recueil de l'urine :

- Après lavage hygiénique des mains et toilette soigneusement au savon ou antiseptique doux de la région vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme suivi d'un rinçage,
- Eliminer le premier jet d'urine pour ne recueillir dans le flacon stérile que les 20 ml du milieu du jet au minimum en prenant soin de ne pas toucher le bord supérieur du récipient.
- Fermer hermétiquement le flacon, et le porter immédiatement au laboratoire accompagné de la prescription.
- Identifier très précisément l'échantillon et l'heure de prélèvement.
- En cas d'empêchement le placer pour quelques heures à + 4°C.

• Au laboratoire

Dès réception de l'échantillon, il est enregistré par la secrétaire avec un numéro de laboratoire puis porté sur une feuille de paillassette et envoyé à l'unité de bactériologie. Une fois à l'unité l'échantillon est enregistré de nouveau dans le registre d'ECBU où il va subir la technique suivante :

➤ Examen macroscopique :

Cet examen a permis d'apprécier l'aspect et la couleur de l'urine. L'urine normale est de couleur jaune ou jaune dorée, limpide et transparente.

L'urine pathologique peut avoir un aspect trouble, d'origine bactérienne et/ou leucocytaire. Mais l'aspect trouble d'urine n'est pas toujours pathologique, il peut s'agir d'un dépôt de cristaux ou de pertes vaginales. L'aspect hématurique de l'urine est dû à une hématurie.

➤ Examen microscopique :

Il a consisté à rechercher la présence de :

- leucocytes,
- cellules épithéliales,
- hématies,
- parasites et levures,

- cristaux, ainsi que la présence ou l'absence des bactéries dans les échantillons, leur mobilité ou pas.

Procédure :

➤ **quantitative**

C'est la méthode de la cellule de numération de KOVA solide, qui est utilisée pour la lecture à l'aide d'un microscope optique, dont 10 µl est examinée via l'objectif 40, on dénombre les éléments figurés contenus dans l'urine.

En cas d'infection urinaire le processus inflammatoire se traduit par la présence des leucocytes.

Protocole

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

N.B : Règles d'utilisation de la cellule de KOVA

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

➤ **Aspect qualitatif :**

L'examen du frottis est réalisé à partir du culot de centrifugation et la coloration de Gram qui va déterminer le choix du milieu de culture.

➤ **Préparation du culot urinaire**

Mélanger délicatement l'urine à l'aide d'une micropipette afin d'homogénéiser ; Identifier un tube conique à centrifuger et le remplir aux ³/₄ d'urine homogénéisée ; Centrifuger pendant 5 à 10 minutes, à vitesse moyenne (1500 tr/ min);

- **coloration de Gram : procédure (annexe1)**

La coloration de Gram a permis de donner le diagnostic morphologique des bactéries et a permis le choix des milieux de culture.

Ensemencement :

Les bacilles Gram négatifs ont été ensemencés sur une gélose chromogène (Uriselect). C'est après homogénéisation, 10 µL d'urine totale est ensemencée cadran par cadran au près du Bec Bensen puis incubé à 37 °C + 1 à l'étuve pendant 18 à 24 heures.

Culture :

Au bout de 18 à 24 Heures les boîtes de Pétri ont été sorties de l'étuve. La lecture a permis d'observer la présence ou l'absence de bactéries, de décrire les colonies, puis de procéder à l'identification par API 20^{NE} ou par Automate VITEK® 2. (Voir 1.7 et 1.8)



Figure 16: Aspect des colonies d'*A.baumannii* de milieu de culture Uriselect



Figure 17: Aspect de colonies de *P.aeruginosa* sur milieu de culture Uriselect

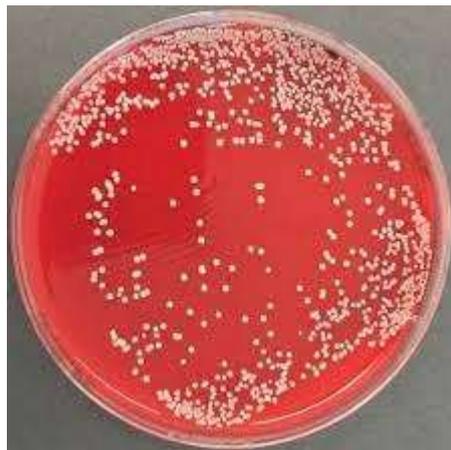


Figure 18: Aspect de colonies de *B. cepacia* sur milieu de culture Uriselect

1.3. Prélèvement vaginal :

Les conditions strictes qui doivent être observées par la patiente sont :

- En dehors des menstrues,
- Ne pas avoir de rapport sexuel la veille du prélèvement,
- Ne pas se nettoyer le vagin le jour du prélèvement.

➤ Prélèvement :

Ce prélèvement est réalisé soit dans le service clinique, soit au laboratoire le plus souvent c'est le cas. La patiente s'installe dans la salle de prélèvement vaginal en position d'examen gynécologique.

Une technicienne de laboratoire est chargée de réaliser le prélèvement.

Une fois installée le spéculum est introduit dans le vagin dans le but de rendre visible et accessible le col de l'utérus. Une fois le spéculum mis en place, le frottis se faisait à l'aide d'une petite spatule ou d'un bâtonnet muni de poils souple en grattant légèrement la surface des tissus à analyser. Le prélèvement des cellules pouvait avoir lieu dans le fond du vagin, à la surface du col de l'utérus et dans le canal du col de l'utérus selon la demande d'examen.

A la fin de cette opération, l'écouvillon urétral ou endocervical pour la recherche de *Neisseria gonorrhoeae* est étalé sur une lame propre bien dégraissée pour réaliser un frottis sec qui sera coloré au Gram. Puis la spatule est déchargée dans 1 mL d'eau physiologique contenue dans un tube à essai stérile.

Le prélèvement est apporté au secrétariat, dès réception de l'échantillon, il est enregistré par la secrétaire avec un numéro de laboratoire puis porté sur une feuille de paillasse et envoyé à l'unité de bactériologie. Une fois à l'unité l'échantillon est enregistré de nouveau dans le registre de prélèvement vaginal où il va subir la technique suivante :

➤ **Examen Macroscopique :**

La vulve pouvait être normale ou inflammatoire présentant des lésions.

La muqueuse vaginale normale est de couleur rose sans douleur au contact. La muqueuse inflammatoire est de couleur rouge, pouvant être douloureuse au contact et présentant des lésions.

L'endocol non sain ou présente des lésions, saignantes au contact.

L'examen macroscopique permet de noter l'aspect des sécrétions :

Abondance : peu abondantes, abondantes, très abondantes ;

Consistance : épaisses, adhérentes aux parois vaginales, caillébotées, liquides, glaireuses, bulleuses, purulentes.

La couleur de la leucorrhée : blanchâtres, jaunâtres, verdâtres, grisâtres etc.

➤ **Examen chimique**

Cet examen chimique consiste à mesurer le pH des sécrétions à l'aide du papier à pH. Le pH normal est < 4,5.

➤ **Examen microscopique**

Une goutte de suspension des sécrétions vaginales est placée entre lame et lamelle et observée au microscope à l'objectif 40. Cet examen consiste à la recherche à l'état frais de :

- cellules épithéliales : pour apprécier l'exfoliation de l'épithélium.

- polynucléaires,

- éléments parasitaires : les levures (*Candida*) et leurs filaments mycéliens, *Trichomonas vaginalis* reconnaissable par sa mobilité et ses flagelles,

-La flore bactérienne : la présence et la mobilité des bactéries ou leur absence.

L'examen microscopique après coloration de Gram :

Après examen à l'état frais, les lames ont été étalées et fixées puis la coloration de Gram a été réalisée (voir annexe 1).

Une fois la coloration de Gram réalisée les lames ont été séchées et examinées au microscope à l'objectif 100. Cet examen a permis d'apprécier :

-La morphologie des bactéries (bacilles, cocci, diplocoques à Gram négatif),
- la flore bactérienne :

- La flore normale est constituée d'une prédominance de bacilles de Doderlein (lactobacillus),
- « Clues Cells » (cellules épithéliales tapissées par des coccobacilles à Gram négatif : *Gardnerella vaginalis*),
- bacilles à Gram négatif incurvés aux extrémités effilées (*Mobilincus spp*),
- diplocoques à Gram négatif intra ou extra leucocytaires,
- Une flore déséquilibrée, constituée d'une minorité ou d'une absence de bacilles de Doderlein.
- Après la coloration de Gram, la morphologie des bactéries a motivé le choix du milieu de culture.

➤ **Culture**

Ensemencement :

Les écouvillons endocervical et urétral ont été ensemencés sur le milieu Eosine Méthylène Blue (EMB).

Incubation :

L'incubation est faite à 37°C pendant 18 à 24h.

Identification du germe

La lecture sur milieu EMB a été faite selon l'aspect des colonies.

Les colonies dont leur identification à l'œil nu reste difficile ont été passées à l'identification par API 20^{NE} ou par automate VITEK® 2. (Voir 1.8 et 1.9)

Coproculture :

➤ **Prélèvement :**

Les selles ont été recueillies dans un récipient stérile puis acheminer au laboratoire dans un délai de 30 minutes ou dans l'heure ; parfois le recueil a lieu au laboratoire.

➤ **Analyse et traitement de l'échantillon**

✓ **Examen macroscopique**

Cet examen a permis d'apprécier :

-l'aspect des selles : la consistance des selles (pâteuses/molles, liquides, semi-liquides, présence de glaire ou de sang) et la couleur.

-le contenu : (débris végétaux, grains de légumes ou de fruits)

✓ **Examen microscopique**

Etat frais

-Identifier et mettre 2 à 3 mL d'eau physiologique dans un tube à hémolyse,

- Faire plusieurs prélèvements en différents points de la selle de façon à collecter une quantité de selles équivalente à un petit pois ou un grain de maïs et les plongés dans le tube à hémolyse contenant de l'eau physiologique,

- Homogénéiser par aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette pasteur en plastique (jusqu'à fragmentation complète de grosses particules ou des parcelles de glaires),

- Laisser sédimenter les grosses particules pendant 2 minutes,

- Déposer une goutte de la suspension homogène sur une lame, couvrir d'une lamelle et observer au microscope à l'objectif x 10 puis 40,

- Lire 20 à 40 champs minimum.

Après cette lecture à l'état frais, la coloration de Gram a été réalisée (voir annexe 1).

Cette coloration permet :

-d'apprécier l'équilibre de la flore bactérienne : une flore normale est abondante et polymicrobienne (bacilles à Gram positif ou négatif). Chez les patients dont l'âge est supérieur à 2 ans, la flore est à prédominance négative tandis que chez les patients dont l'âge est inférieur à 2 ans, elle est à prédominance positive.

- La morphologie particulière de certaines bactéries : bacilles incurvés (*Vibrio*, *campylobacter* etc.).

- Cet examen permettait de corriger le dénombrement des leucocytes qui passent inaperçus à l'état frais.

➤ **Culture**

Ensemencement :

La gélose Hektoen a été le milieu sur le quel toutes selles ont étéensemencées. 10 µL de la suspension contenue dans le tube à hémolyse a étéensemencé cadran par cadran.

Incubation :

L'incubation a été faite à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24h.

Identification du germe :

L'identification a été faite par API 20^{NE} ou par automate VITEK® 2. (Voir 1.7 et 1.8)

1.4. Pus

➤ Prélèvement

Les échantillons ont été recueillis sur deux écouvillons stériles dont l'un sert à faire le frottis pour la coloration de Gram et l'autre pour l'ensemencement sur des milieux de culture appropriés.

➤ Examen macroscopique

Cet examen consiste à apprécier :

- la couleur : varie de la teinte chocolat au blanc, certains pus sont verdâtres ou bleutés,
- l'aspect,
- la viscosité : Le pus peut être épais, visqueux, élastique, mélangé au sang ou non, fluide ou séreux.

Lorsqu'un prélèvement était assez abondant, l'examen macroscopique (odeur, couleur de pus) peut fournir des renseignements intéressants :

- l'odeur nauséabonde des pus à anaérobies,
- l'aspect granuleux, mal lié, des pus à streptocoques,
- Les pus crémeux à Staphylocoques ou à Pneumocoques sont des éléments d'orientation dont il faut tenir compte.

➤ Examen microscopique

✓ Etat frais

Une goutte du prélèvement est déposée sur lame porte-objets. On ajoute une lamelle puis on observe au microscope optique, au grossissement x40. Cet examen permet de :

- Distinguer les cellules d'accompagnement : soit des polynucléaires neutrophiles ou des lymphocytes (étude qualitative et quantitative),
- Constater l'état des cellules (intactes ou altérées),
- Observer la morphologie et la mobilité des bactéries éventuelles.

✓ Coloration de Gram

Après coloration de Gram (annexe1), les lames sont observées au microscope optique, au grossissement X 100.

Cet examen a permis d'apprécier

- La morphologie
- La position intra ou extracellulaire,
- en cas de pus polymicrobien, l'espèce dominante, et leur abondance

➤ **Culture**

✓ **L'ensemencement :**

La culture a été faite sur milieu EMB, l'incubation a été faite à 37°C pendant 18 à 24h.

Identification :

On passe à l'identification par API 20^{NE} ou par Automate VITEK® 2. (Voir 1.8 et 1.9))

1.5. Expectations :

✓ **Prélèvement :**

Le prélèvement a été effectué le matin par le patient au réveil après hygiène buccale. Le patient recueille les sécrétions du fond du poumon grâce à un effort de toux dans un pot stérile et transparent.

✓ **Examen macroscopique**

Cet examen a permis d'apprécier l'aspect des expectorations :

Muqueux : donnant un aspect en gelée avec de rares parcelles purulentes,

- Mucopurulent : muqueux avec des parcelles de pus plus nombreuses,
- Salivaire,
- Fluide et purulent,
- Visqueux et adhérent.

- On précisait aussi la couleur: rouille, verdâtre, hématiche.

Certaines caractéristiques permettent d'orienter le diagnostic. Ainsi, la présence de grains jaunes est caractéristique d'une actinomycose. De même, la perception (attention : ne pas sentir volontairement) d'une odeur fétide témoigne de la présence d'anaérobies.

Les expectorations de classe 1 et 2 devaient être rejetées, celles de classe 3 et 4 montrent une bonne réaction inflammatoire, mais ont été contaminées par la salive. Les expectorations de classe 4 ont été acceptables et celles de classe 5 ont été les plus appropriées.

Classe	Nombre de cellules par champs (objectif 10)	
	Cellules épithéliales	Leucocytes
1	>25	< 10
2	> 25	10-25
3	> 25	> 25
4	10-25	> 25
5	< 10	> 25

Si le nombre de leucocytes est supérieur à 25 : apprécier la flore bactérienne : on notait les bactéries prédominantes ou bactéries ramifiées (Nocardia).

-Lorsque le nombre de leucocytes est supérieur à 25 : apprécier la flore bactérienne :

En notant les bactéries prédominantes ou bactéries ramifiées (Nocardia)

- **Isolement du germe :**

La culture des échantillons est faite après la coloration de gram sur le milieu EMB. Un isolement est effectué pour chaque souche sur le milieu pour les prélèvements vaginaux.

- **Incubation :**

L'incubation est faite à 37°C pendant 18 à 24h.

- **Identification du germe**

La lecture sur milieu EMB se fait selon l'aspect des colonies

Les colonies dont leur identification à l'œil nu reste difficile, On passe à l'identification par API 20NE ou par Automate VITEK® 2. (Voir 1.7 et 1.8)

1.6. Liquide d'ascite :

L'ascite : se définit par la présence d'un épanchement liquidien non sanglant, non purulent, non bilieux dans la cavité péritonéale.

- ✓ **Prélèvement :**

Les prélèvements ont été effectués par le médecin et recueilli dans un pot stérile ou dans une seringue. Le produit pathologique est de nature stérile, le transport et la mise en culture était rapide. Le délai d'acheminement était inférieur à 2 heures.

- ✓ **Examen macroscopique**

Cet examen a permis d'apprécier l'aspect du liquide : purulent, hémorragique, sérofibrineux, présence de coagulum.

- ✓ **Examen microscopique**

Cet examen nous a permis de faire la numération des hématies et leucocytes du liquide avec la cellule de Kova

Trois frottis ont été réalisés sur le culot de centrifugation (40 000 rpm pendant 5 min), dans un tube à hémolyse.

La réalisation de la coloration de Gram (annexe 1) nous a permis d'apprécier la flore bactérienne et la coloration au MGG a permis d'apprécier la formule leucocytaire.

- ✓ **Culture**

- Ensemencement :**

La coloration de Gram a permis le choix du milieu de culture : Eosine Méthylène Blue.

- Identification :**

L'identification s'est reposée sur les caractères morphologiques, culturels, biochimiques et conventionnels standards.

1.7. Identification bactérienne et antibiogramme sur VITEK® 2 Compact

➤ Principe

L'identification biochimique, des souches de bacilles Gram négatifs non fermentaires a été réalisée sur le VITEK® 2 Compact ou par la galerie API 20NE.



Figure 19: Automate VITEK® 2 Compact.

Le système VITEK®2 COMPACT est destiné à l'identification des bactéries et levures, ainsi qu'à la réalisation d'antibiogrammes pour les bactéries significatives au plan clinique. Le système comprend l'instrument VITEK®2 COMPACT, un ordinateur et une imprimante. Le logiciel fourni pour le système VITEK®2 COMPACT inclut des programmes d'analyse, de gestion des données et un système de qualité afin de valider le kit test du VITEK®2 COMPACT.

- Mode Opérateur

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

NB : Pour un germe, deux tubes secs ont été utilisés, l'un pour l'identification et l'autre pour l'antibiogramme.

- Sur une feuille vierge, porter la date et le numéro de l'échantillon ainsi que le nom approximatif du germe à identifier ;

- A partir de la culture pure sur gélose (culture jeune 24 h), à l'aide d'une oese, prélever quelques colonies et les introduire dans le tube sec contenant la solution saline ;
- Homogénéiser la suspension et bien passer au vortex ;
- A l'aide du densitomètre, mesurer la concentration bactérienne à 0,5 McFarland ;
- Poser le tube contenant la suspension bactérienne en première position et faire suivre celui prévu pour l'antibiogramme ;
- **Préparer la solution pour antibiogramme :**
 - Pour les bactéries à Gram négatif, utiliser la micropipette calibrée à 145µl (rouge) ;
 - A partir de la suspension bactérienne, nous avons pipeté et dilué dans 3ml d'eau saline contenu dans le tube voisin. On aurait ainsi préparé la suspension pour l'antibiogramme.
 - Placer la carte d'identification GN et la carte pour l'antibiogramme AST- N sur la cassette.

NB : différentes cartes utilisables :

ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ;

- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;
 - Cliquer sur Vitek 2
 - Cliquer sur gérer la cassette virtuelle
 - Créer une cassette virtuelle - Identification de la cassette 1, 2...
 - Lecture du code à barre de chaque carte à partir de la douchette
 - Saisir les données de l'isolant ;
 - Entrer les informations de l'isolat (numéro attribué au laboratoire, nom du germe si déjà identifié par d'autres techniques)
 - Puis enregistrer les données de la cassette virtuelle
 - Au niveau de l'automate Vitek 2 Compact,
 - Ouvrir le capot de remplissage et insérer la cassette à l'intérieur de la chambre
 - Fermer le capot de remplissage
 - Appuyer sur la touche Lancer remplissage, un bip indique que le cycle de remplissage est terminé ;
- Retirer la cassette du capot de remplissage et l'introduire dans la chambre de lecture où s'effectue le scellage. Le processus de chargement/déchargement permet la lecture du code à barre des cartes et le code à barre de la cassette ;
- Lorsque le message retiré s'affiche dans la chambre de lecture, cela indique que le Vitek 2 a terminé le traitement des cartes contenues sur la cassette. On peut la retirer en ouvrant le capot chargement puis le refermer ;
 - On attend le jour suivant où les résultats seront imprimés.

✚ Résultats

Le Vitek 2 Compact est un appareil qui permet d'identifier les germes et de réaliser l'antibiogramme puis d'interpréter les phénotypes de résistances acquise et naturelle puis la sensibilité naturelle du germe.

✚ Gestion des déchets

- Retrait des cartes éjectées
- Retrait du réceptacle collecteur de déchet

1.8. Identification bactériennes sur API 20 NE :

Le but de ce mode opératoire est de définir les règles, les moyens et les responsabilités nécessaires à l'identification des germes bactériens isolés en Microbiologie sur l'Api 20NE.

➤ Principe

La galerie API 20 NE se compose de 20 micro-tubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Il permet l'identification des bacilles gram (-) non entérobactéries par la réalisation rapide et facile de tests biochimiques miniaturisés. Il y a une partie pour l'auxanogramme et une autre pour le zymogramme (les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant). Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.



Figure 20 : Image d'identification d'une souche d'*Acinetobacter* spp avec la galerie API N20NE.

Mode Opératoire (annexe 3)

➤ Préparation de la galerie :

- Répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire les références de la souche bactérienne sur la languette latérale de la boîte (+ date et initiales de l'opérateur).
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum :

Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl 0,85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mcfarland.

➤ **Inoculation de la galerie :**

- Remplir uniquement les tubes des tests (et non les cupules) NO₃ à PNPG avec la suspension bactérienne.
- Eviter la formation de bulles.
- Créer une anaérobiose dans les tests GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Transférer 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule AUX Medium.
- Homogénéiser
- Remplir les micro-cupules des tests GLU à PAC.

Un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave.

- Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

Notre étude au respect strict de la confidentialité des données et l'anonymat des patients. Les souches de bactéries multi résistantes sont conservées dans des congélateurs dont l'accès est limité. Les bonnes pratiques de laboratoire ont été respectées au cours de cette étude.

➤ **Lecture de la galerie**

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en référant au tableau de lecture.
- Noter sur la fiche de résultat toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, UREE, ESC, GEL, ONPG)
- La révélation de deux tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela ; placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests ; pendant la période de révélation de tests NO₃ et TRP.
- Test NO₃ :
 - Ajouter une goutte de réactifs NIT1 et NIT2 dans la cupule NO₃.
 - Après 5 min une couleur **rouge** indique une **réaction positive** à noter sur la fiche de résultat
 - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) dans la cupule NO₃
 - Après 5min ; une cupule restée **incolore** indique une **réaction positive** à noter sur la fiche de résultat
 - Si la cupule devient **rose-rouge** ; la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduit en nitrites par le zinc.
 - La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction de nitrates, elle est **positive** si l'une ou l'autre de deux réactions précédentes (production de N₂) est positive.

- La production de N2 peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le catalogue analytique.
- Test TRP :
 - Ajouter une goutte de réactif JAMES, une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive

➤ **Interprétation :**

L'identification est obtenue à partir du **profil numérique**

➤ **Détermination du profil numérique :**

Sur la fiche de résultat, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur 1;2 ou 4 est indiquée pour l'intérieur de chaque groupe la valeur correspondant à des **réactions positives**. On obtient 7 chiffres, la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est effectuée de la valeur 4 lorsqu'elle est **positive**

➤ **Identification :**

Elle est réalisée à partir de la base de données (V7)

A l'aide du catalogue analytique, rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

(Annexe 3)

4.9. Saisie et analyse des données :

Les données ont été saisies sur Excel (version 2016) et analysées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics version 19.

4.10. Considération éthique

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un travail de routine. Avec l'autorisation du responsable du laboratoire Biotech de FORUM médical de Bamako, nous avons veillé tout au long de notre étude au respect strict de la confidentialité de données et l'anonymat des patients. Les souches de bactéries multi résistantes sont conservées dans des congélateurs dont l'accès est limité. Les bonnes pratiques de laboratoire ont été respectées au cours de cette étude.

RÉSULTATS

5. Résultats

Au cours de la période d'étude un ensemble de 462 bactéries ont été isolées. Parmi lesquelles les bacilles Gram négatifs non fermentaires ont représenté 10% (n=46) de souches. *Pseudomonas spp* 20 (43,5%), *Acinetobacter baumannii* 15 (32,6%), *Chryseomonas lutéola* 10 (21,7%) et *Burkholderia cepacia* 1(2,2%).

5.1. Résultats Socio-démographiques

Tableau VI: Répartition des patients étudiés selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Masculin	25	54,3
Féminin	21	45,7
Total	46	100

Les hommes étaient les plus représentés parmi la population des personnes infectées avec 54,3%, avec un sexe ratio de 1,18 (H/F= 1,18).

5.2. Répartition des patients selon la tranche d'âge :

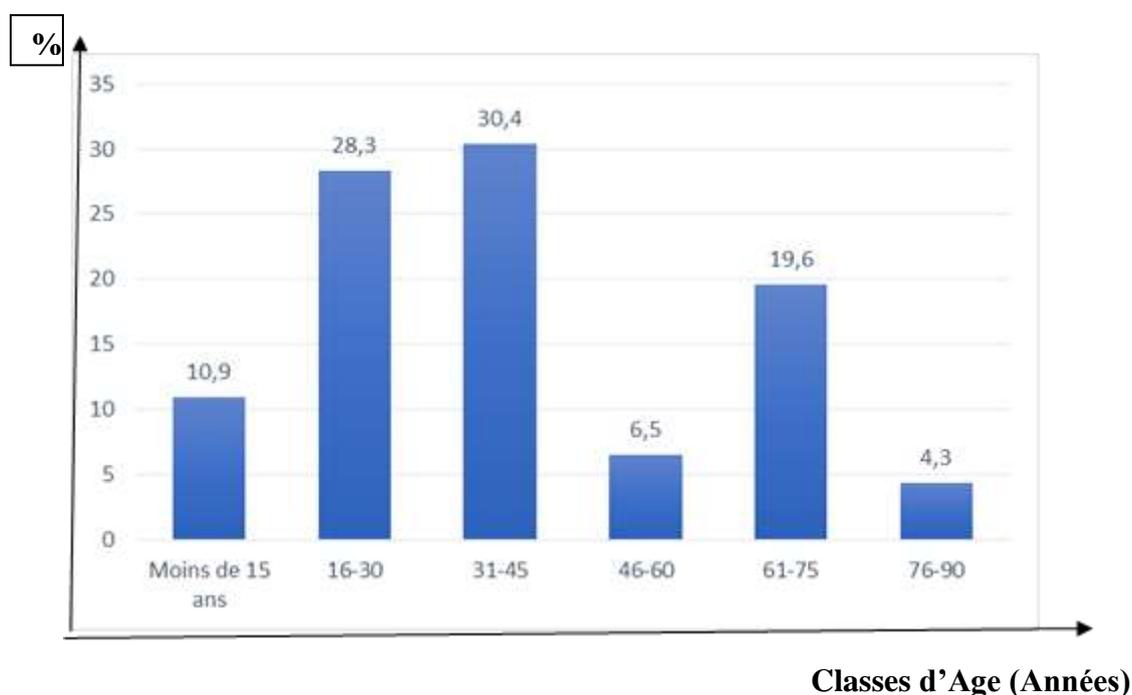


Figure 21 : Répartition des patients étudiés selon les tranches d'âge

L'âge moyen de nos échantillons était de 40 ans durant notre étude.

Les tranches d'âges les plus représentées ont été 31-45 et 16-30

5.2. Résultats Bactériologiques.

5.3. Fréquence selon la nature de prélèvement

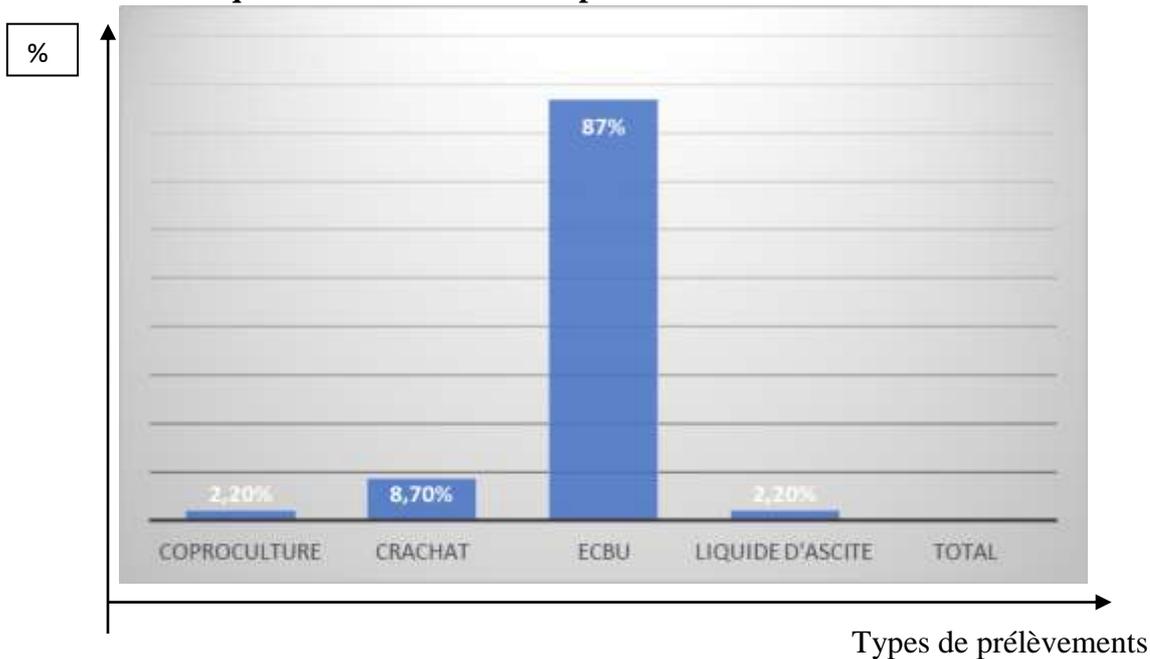


Figure 22: Répartition selon les types de prélèvement

La plupart de nos souches ont été isolées des urines (87%).

Tableau VII : Fréquence d'isolement des espèces de Bacille à Gram négatif non fermentaire.

Espèces	Effectif	Pourcentage %
<i>Pseudomonas spp</i>	20	43.5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	15	32.6
<i>Chryseomonas lutéola</i>	10	21.7
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	2.2
Total	46	100

Pseudomonas spp a été l'espèce bactérienne la plus isolée avec 43,5% suivi d'*Acinetobacter baumannii* 32,6% et de *Chryseomonas lutéola* 21,7%.

Tableau VIII: Résistance aux β -lactamines des souches fréquemment isolées.

Famille	Molécules d'ATBs testées	<i>Pseudomonas spp</i> N=20	<i>A baumannii</i> N=15	<i>C. lutéola</i> N=10
		R (%)	R (%)	R (%)
<i>β-lactamines</i>	TIC	5 (25)	11 (73)	5(50)
	TZP	3 (15)	11 (73,3)	2 (20)
	CAZ	3 (15)	3 (15)	2 (20)
	IMP	5 (25)	2(13,33)	3(30)

AMC = Amoxicilline / Acide clavulanique ; TIC= Ticarcilline; TZP= Piperacilline / Tazobactam ; IMI= Imipénème ; CEF= Cefalotine ; CAZ= Ceftazidime ; CRO= Ceftriaxone.

N : nombre de souche

Les souches de *Pseudomonas spp* ont présenté un niveau de résistance faible aux pénicillines notamment à la Ticarcilline et imipénème avec des résistances de 25%. Une nette amélioration de l'activité des pénicillines a été observée avec l'association (Pipéracilline + tazobactam) et ceftazidime, qui ont tous deux enregistrés 15% de résistance.

Les souches de *Chryseomonas lutéola* ont présenté un niveau de résistance élevé aux pénicillines notamment à la Ticarcilline avec une résistance de 50%. Une nette amélioration de l'activité des pénicillines a été observée avec (Pipéracilline + tazobactam) et ceftazidime qui ont enregistré 20% de résistance. Cependant Nos souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été les plus résistantes à la ticarcilline et à l'association piperacilline/tazobactam.

Tableau IX: Résistance aux aminosides des souches BGNnF fréquemment isolées

		Germes		
Famille	Molécules d'ATBs testées	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. Lutéola</i>
		N=20	N=15	N=10
Aminosides		R (%)	R (%)	R (%)
	AKN	1 (5)	3 (20)	
	GEN	4 (20)	6 (40)	6 (60)
	TOB	1(5)	5 (33,33)	2 (20)

AKN= Amikacine ; GEN= Gentamicine ; TOB= Tobramicyne

N : nombre de souche de la bactérie

La gentamicine a été moins active sur nos souches d'*Acinetobacter baumannii* (40%) et des *Chryseomonas lutéola* (60%).

Tableau X: Résistance aux fluoroquinolones des souches de BGNnF fréquemment isolées.

Famille	Molécules d'ATBs testées	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. Lutéola</i>
		N=20	N=15	N=10
Fluoroquinolones		R (%)	R (%)	R (%)
	CIP	7 (35)	10 (66,66)	7 (70)
	OFLO	7 (35)	1 (6,66)	5 (50)

CIP= Ciprofloxacin ; OFL= Ofloxacin

N : nombre de souche

Les fluoroquinolones testés n'ont pas été actifs sur nos souches, à l'exception des souches d'*A.baumannii* qui avaient un taux de résistance de 6,66 % vis-à-vis de l'ofloxacin.

Tableau XI : Prévalence des bactéries multi-résistantes des BGNnF

Espèce	Nombre de bactéries isolées	BMR	
		Effectif	%
<i>Pseudomonas spp</i>	20	5	25
<i>A.baumannii</i>	15	4	26,66
<i>C. lutéola</i>	10	5	50
<i>B. cepacia</i>	1	1	100
Total	46	15	32

Une souche sur deux de *C. lutéola* ont été multi-résistantes, suivi de d'*A.baumannii* et de *Pseudomonas spp* respectivement 26,66% et 25%, soit dans l'ensemble 32% de nos souches ont été des bactéries multi-résistantes.

Tableau XII: Phénotypes de résistance des BGNnF isolées aux β -lactamines.

Phénotype de résistance aux différentes familles d'antibiotiques testées		Espèces étudiées		
		<i>Pseudomona s spp</i> N=20 (%)	<i>A. baumannii</i> N =15 (%)	<i>C.lutéola</i> N =10 (%)
Bétalactamines	Sauvage	3 (15)	1(6,6)	2(20)
	Céphalosporinase hyperproduite	5(25)	1(6,66)	0
	BLSE	4(20)	10(66,66)	4(40)
	Sensible	0	1(6,66)	0
	Pénicillinases TEM	3(15)	1(6,66)	0
	Oxacillinase spectre étroit	4(20)	0	1(10)
	Carbapénèmase	1(5)	2(13,3)	3(30)

Chez *Pseudomonas spp* le phénotype céphalosporinase hyperproduite a été le plus représenté pour les bêtalactamines; Cependant pour *A.baumannii* le phénotype *BLSE* a été le plus représenté pour les bêtalactamines et le phénotype sauvage pour les aminosides.

Tableau XIII: Phénotypes de résistance des BGNnF isolées aux Aminosides et Fluoroquinolones.

Phénotype de résistance aux différentes familles d'antibiotiques testées		Espèces étudiées		
		<i>Pseudomonas spp</i> N=20 (%)	<i>A. baumannii</i> N =15 (%)	<i>C.lutéola</i> N =10 (%)
Aminosides	Sauvage	10 (50)	8 (53,3)	4(40)
	G	4(20)	1(6,66)	4(40)
	KT	3(15)	2(13,33)	1(10)
	KTG	1(5)	5(33,33)	3(30)
Fluoroquinolones	Sauvage	9 (45%)	1(6,6%)	2(20%)
	II	2(10%)	5(33,3%)	0
	IV	5(25%)	1(66,6%)	4(50 %)
	Efflux	3(15%)	8(53,33%)	2(20%)

Le phénotype sauvage a été le plus exprimé chez les aminosides avec 53,3% pour *A.baumannii*, 50% pour *Pseudomonas spp* et 40% pour *C. lutéola* ; suivi du phénotype G pour l.

Pour les fluoroquinolones le phénotype IV a été le plus représenté avec 66,6% chez *A. baumannii* suivi du phénotype efflux avec 53,33% pour la même espèce d'*A. baumannii* par contre nous avons observé 50% de phénotype IV pour les souches de *C.lutéola* dans notre étude.

DISCUSSION

6. Discussion :

Le laboratoire où a eu lieu notre étude est une structure privée. Cette étude a permis d'étudier l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches bactériennes isolées pendant la période d'étude. Elle nous a permis de déterminer la fréquence d'isolement des souches étudiées. Globalement le profil bactériologique des souches isolées est marqué par une légère prédominance de *Pseudomonas spp* (43,5%) suivi d'*Acinetobacter baumannii* (32,6%), et de *Chryseomonas lutéola* (21,7%). L'identification de nos souches a été faite sur la base des caractères morphologiques, biochimiques et culturels. L'interprétation des résultats de l'antibiogramme a été faite conformément aux recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. En effet la coloration de Gram nous orientait sur la morphologie de germes isolés.

6.1. Méthodologie

Nous avons conduit cette étude de nature transversale prospective qui nous a permis de rapporter 10% de bacilles gram négatif non fermentaires. Notre étude avait pour objectif d'évaluer le profil de résistance aux antibiotiques des souches isolées au laboratoire Biotech.

Bien que l'acheminement des produits pathologiques vers le laboratoire se soit déroulé sans difficulté majeure, l'étude a été confrontée à quelques limites à savoir:

- Le lieu de l'étude est un laboratoire de diagnostic et non de recherche qui pourrait expliquer la baisse de notre taille de l'échantillonnage.
- Le nombre limité de disques des antibiotiques
- Insuffisance du système de collecte des informations auprès des patients reçus au laboratoire biotech : service de consultation, ethnie etc...

6.2 Caractéristiques de la population de notre étude:

Plus de la moitié de nos souches bactériennes étudiées ont été isolées chez les patients de sexe masculin avec 54,7% de l'ensemble de la population étudiée (Tableau II). A l'INSP en 2019 Dembélé a rapporté un taux d'isolement de 55% chez le sexe masculin similaire au nôtre. Cette prédominance masculine peut s'expliquer par le fait que l'infection due à ces deux espèces bactériennes est associée à certains facteurs de risques : le tabagisme, l'alcool ; mais elle ne fait pas la règle car certaines études ont montré une prédominance féminine (43). Et une moyenne d'âge de 40 ans. Cependant nous avons remarqué que plus de 30% de bactéries isolées ont été retrouvées chez les personnes de la tranche d'âge de 31-45 ans (Figure 6).

6.3. Fréquence d'isolement des souches de BGNnF durant la période d'étude :

Au cours de notre étude la fréquence d'isolement de *Pseudomonas spp* était de 43,5% suivi de celle de *A.baumannii* qui était de 32,6% , Ces résultats sont inférieurs à ceux rapportés par **Dembélé**, en 2019, qui a rapporté au cours de son étude des fréquences d'isolement de 75% pour *P aeruginosa* et 45,7% pour *A baumannii*(7).

Par contre **Asma** en 2003 en Algérie a rapporté plus de souches de *A.baumannii* (55,5%) que de *Pseudomonas aeruginosa* (44,44%) (44).

Le même constat a été rapporté par **Pragasam et al** en inde en 2016 qui a rapporté une fréquence de 56,5% de *Acinetobacter baumannii* et 43,5% pour *Pseudomonas aeruginosa*(45).

6.4. Résistance aux antibiotiques des germes isolés au cours de notre période d'étude :

Résistance aux Bétalactamines:

L'étude de la résistance aux antibiotiques de nos souches a mis en évidence des résistances pour chaque groupe la famille des bêtalactamines.

Les souches de *Pseudomonas spp* isolées au cours de notre étude exprimaient des taux de résistance moins élevés aux carboxypénicillines (ticarcilline 25%, ticarcilline et tazobactam 15%). Nos résultats de *Pseudomonas spp* sont inférieurs à ceux obtenus par **Kamga et al** au Cameroun en 2015 qui ont rapporté 35,5% de résistance à la ticarcilline 23,5% pour la piperacilline et le tazobactam(46). Cependant notre étude a rapporté un taux élevé de résistance d'*Acinetobacter baumannii* aux antibiotiques. Elle fait état de 73 % de résistance à la ticarcilline et 73,3 % de résistance pour la Pipéracilline et le tazobactam ; des taux de résistance supérieurs à ceux d'**Ebongue et al** en 2014(47) qui ont rapporté des taux de résistance de 67,29% à la Ticarcilline et 56,97 % à la pipéracilline /tazobactam. Ce pourcentage élevé de résistance des souches de *A.baumannii* à ces antibiotiques n'est pas un fait nouveau car de nombreuses données de la littérature évoquent ce phénomène, qui pourrait s'expliquer par l'utilisation de ces molécules dans des nombreux traitements probabilistes mais aussi de la pression de sélection médicamenteuse. Au cours de notre période d'étude la résistance aux céphalosporines de 3ième génération était moins élevée, nos taux sont inférieurs à ceux de **Dembélé** qui a rapporté une résistance de 23,2% dans une étude réalisée en 2019 à L'INSP(7). Parmi les molécules testées de la famille des bêtalactamines, l'imipénème avait une très bonne activité sur nos souches soit 25% de résistance pour *Pseudomonas spp* et 13,33% de résistance pour *A. baumannii* ; nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux rapportés par l'European Antimicrobial Résistance Surveillance Network (EARS-Net) qui a retrouvé un taux de résistance de 9,6 % aux carbapénèmes en 2017 (Imipénème et Méropénème) en Europe(48). Par contre l'étude de **Dembélé** en 2019 a montré une résistance à l'imipénème de 10,7 % pour *Pseudomonas aeruginosa* et un taux de

résistance de 31,6% pour *A. baumannii* aux carbapénèmes (Imipénème et Méropénème). Cela pourrait avoir son explication dans le fait que ses molécules sont peu prescrites et restent toujours cher sur le marché.

Résistance aux aminosides des souches isolées

Les aminosides ont été les molécules qui ont eu moins de résistance après les carbapénèmes sur nos souches isolées au cours de notre étude à l'exception de la gentamicine.

Par ailleurs nous notons une résistance élevée à la gentamicine de nos souches : soit 60% pour *C. lutéola* suivi de 40% pour *A.baumannii* et 20% pour *Pseudomonas spp*. Cependant nos données sont inférieures à celles rapportées par **Al Dawodeyah** et **al** en 2018 en Jordanie(49) qui ont obtenu 50,8% et 62,3% de résistance aux aminosides respectivement à l'Amikacine et à la Gentamicine. Cependant l'activité de l'amikacine reste très efficace sur nos souches avec un taux de résistance moins élevé de 5% pour *Pseudomonas spp* et 20% pour *A.baumannii*.

Nos résultats concernant les aminosides sont inférieurs à ceux rapportés par **Dembélé** lors de son étude portant sur la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *A. baumannii* isolées en routine à l'INSP de Bamako en 2019 qui a observé 19,6% de résistance à l'amikacine et 26,8% de résistance à la gentamicine (7).

Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones étant considérés comme un moyen de traitement très efficaces dans les infections bactériennes ; nos résultats nous montrent que les deux molécules testées de cette famille plus d'une souche sur deux étaient résistantes à ces molécules pour la plupart de nos souches ; à l'exception des souches de *A. baumannii* qui avaient une fréquence de résistance de 6,66% pour l'ofloxacine.

Nos données de résistance concernant la ciprofloxacine étaient de 35%. Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par les centres hospitaliers étrangers tels que celles de la Tunisie (53%)(), et de France (68%) ont fait le même constat que nous(44, 45 46) .

Asma a obtenu en 2013 un taux de résistance à la ciprofloxacine de 97,14% pour *P.aeruginosa* et 80% pour *A.baumannii* (44) par contre nous avons obtenus de fréquences inférieures de résistance 35% pour *Pseudomonas spp* et 66,66% de résistance pour *A.baumannii* . L'utilisation en antibiothérapie probabiliste des fluoroquinolones en particulier la ciprofloxacine et l'ofloxacine pour traiter les infections bactériennes pourrait expliquer les taux de résistance élevés à cette famille d'antibiotique.

6.5. Fréquence d'isolement des bactéries multi-résistantes (BMR) :

Sur l'ensemble de nos souches nous avons obtenu 32% de souches bactériennes multi-résistantes.

Pour les trois principales espèces isolées nous avons eu une souche sur deux pour *C.lutéola*, 26,66% pour *A.baumannii*, et 25% pour *Pseudomonas spp*.

Cependant nos résultats concernant *Pseudomonas spp* sont supérieurs à celles rapportées par **Cholley** en 2010 qui a rapporté un taux de BMR de 5,8% de souches de multi résistance au cours de son étude(52).

Dans notre étude 26,66% des souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été multi-résistantes. Cette multi résistance a été retrouvée également prouvée dans l'étude de **Soukaina** qui a rapporté un taux supérieur à la nôtre de 50% de BMR des isolats d'*Acinetobacter baumannii* à l'hôpital militaire Moulay Ismail au Maroc en 2017.

Phénotypes de résistance des souches bactériennes isolée

L'étude des phénotypes de résistance de nos souches isolées montre que les phénotypes sauvages pour les bêtalactamines étaient de 15% pour *Pseudomonas spp* 6,6% pour *A.baumannii* et 50% pour *C. lutéola*.

Cependant nous avons observés au cours de notre étude une fréquence de phénotypes de céphalosporinase hyperproduite de l'ordre de 25% pour *Pseudomonas spp*, et 50% pour *C. lutéola*.

Notre fréquence de phénotype céphalosporinase hyperproduite pour l'espèce *Pseudomonas spp* est inférieure à celle rapportée par **Asma** en 2013 à Alger dans une étude portant sur la résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatifs non fermentaires au C.H.U de Tlemcen(44) qui est de 50%. Par contre notre pourcentage de souches productrices de céphalosporinase hyperproduite (25 %) est plus élevé que celui de **Traoré** qui avait apporté 10% au cours de son étude en 2019 au CHU du Point G (53).

Selon **Livermore** et **Woodford**, le nombre de souches d'*Acinetobacter* qui Synthétisent les β -lactamases de type BLSE est faible. En effet, nos résultats vont dans le sens opposé avec 10 souches sur 15 soit 66,66% de souches productrice de BLSE(18). Cependant cette bactérie possède une capacité remarquable à accumuler des mécanismes de résistance.

Pour le phénotype sauvage notre fréquence (15%) pour *Pseudomonas spp* est inférieure à celle rapportée par **Dembélé** en 2019(7) qui est de 44,6%.

Pour les aminosides, la fréquence des souches de phénotype sauvage était de 50% pour *Pseudomonas spp*, 53,3% pour *A.baumannii* et 40% pour *C.Lutéola*.

Pour les fluoroquinolones les fréquences des souches de phénotype sauvage ont été respectivement : 45% pour *Pseudomonas spp*, 6,6% pour *A. baumannii* et 20% pour *C.Lutéola*.

Parmi nos souches isolées nous avons observé 25% de souches productrices de pénicillinase TEM pour *Pseudomonas spp*.

Les fréquences de nos souches productrices de carbapénèmase ont été : 5% pour *Pseudomonas spp*, 13,33% pour *A. baumannii* et 30% pour *C. lutéola*.

Cependant Traoré a rapporté en 2019 au C.H.U de point G au Mali une fréquence de souches productrices de carbapénème de 0,4% pour *Pseudomonas spp* ; Cette proportion est très bas par rapport à celle obtenue durant notre étude pour cette souche(53).

Pour les phénotypes concernant les aminosides nous avons retrouvé le phénotype KGT avec des fréquences qui étaient de 5% pour les souches de *Pseudomonas spp*, 33,33% pour *A.baumannii* et 30% pour *C.Lutéola* ; pour le phénotype KT nous avons obtenu 15% pour *Pseudomonas spp*, 13,33% pour *A.baumannii* et 10% pour *C.Lutéola*. Par contre nous avons observé des fréquences pour le phénotype G de 20%, 6,66% et 40% respectivement pour *Pseudomonas spp*, *A.baumannii* et pour *C.Lutéola*.

Concernant les phénotypes pour les fluoroquinolones nous avons retrouvé parmi nos souches isolées de *Pseudomonas spp*, 10% de II, 25% de IV et 15% d'efflux et pour *l'A.baumannii*, nous avons retrouvé 33,3% de II, 66,6% de IV, et 53,33% d'efflux.

CONCLUSION

7. Conclusion :

De cette étude il ressort que *Pseudomonas spp* et *A baumannii* étaient les souches de bacilles à Gram négatifs non fermentaires les plus isolées au laboratoire biotech. Nous avons observé des taux élevés (73%) de résistance des souches de *A baumannii* isolées vis-à-vis de la ticarcilline et de l'association piperacilline et tazobactam. Les phénotypes céphalosporinase hyperproduite pour *Pseudomonas spp* et BLSE pour *A. baumannii* ont été les plus retrouvés chez les souches bactériennes isolées de notre population d'études concernant les bêtalactamines.

RECOMMANDATIONS

8. Recommandations :

Au terme de cette étude, nous formulons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires :

- Intégrer les laboratoires privés dans le programme de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
- Renforcer la surveillance de la résistance aux antimicrobiens ;
- Réglementer l'utilisation des antibiotiques en vue de circonscrire le phénomène de résistance aux antibiotiques sensibles.

Au prescripteur :

- Baser la prescription des antibiotiques sur le résultat de l'antibiogramme
- Prescrire de façon rationnelle les antibiotiques pour la diminution de l'émergence de nouvelles souches résistantes à plusieurs antibiotiques ;

Au laboratoire Biotech :

- Améliorer le système de collecte des informations auprès des patients reçus au laboratoire biotech.
- Augmenter le nombre de disques des antibiotiques testés.

9. Références bibliographiques

1. Tebano G, Pulcini C. Bon usage des antibiotiques dans les établissements de santé: comment avancer J Anti-Infect. 2016;18(3):98- 105.
2. Cohen R, Bingen E, Grimprel E, Raymond J, Gendrel D. Résistance aux antibiotiques: un nouveau tournant à ne pas manquer. Archives de Pédiatrie. 2011;18(4):359–61. [PubMed] [Google Scholar].
3. Ouédraogo A-S1, , Somé DA2, , Dakouré PWH3, , Sanon BG3, , Birba E4, , Poda GEA4, et al. Giske CG , Monnet DL, Cars O, Carmeli Y. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008 Mar;52(3):813–21. [Article PMC gratuit] [PubMed] [Google Scholar].
4. Procop GW et al., Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Seventh Edition. 2016. Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins. p.316-431.
5. Ebongue CO, Mengue ER, Mefo'o J-PN, Tsiazok MD, Kouassi RNg, Bum EN. Antimicrobial Multi-Resistance of Acinetobacter baumannii Isolated from Clinical Specimens in Douala (Cameroon). Journal of Diseases and Medicinal Plants. 2015;1(2):31-6.
6. Ouédraogo A-S, , Somé DA, , Dakouré PWH, , Sanon BG, , Birba E, , Poda GEA, et al. Profil bactériologique des infections du site opératoire au centre hospitalier universitaire Souro Sanou de Bobo Dioulasso. Médecine Trop. 2016;71:49- 52.
7. Dembélé S. Etude de la résistance aux antibiotiques des souches de Pseudomonas aeruginosa et Acinetobacter baumannii isolées en routine à l'INRSP de Bamako. thèse USTTB faculté de pharmacie; 19P78;
8. OMS. Résistance aux antibiotiques [En ligne]. [Cité 07 octobre 2021]. Disponible sur : <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
9. Kim L. Plateforme for antibiotic discovery. Nature Reviews Drug Discovery. 2013;12:371- 87.
10. Kim L. Plateforme for antibiotic discovery. Nature Reviews Drug Discovery. 2013;12:371- 87.
11. Payne D.J., Cramp R., Winstanley DJ., et Knowles D.J.C. Comparative Activities of Clavulanic Acid, Sulbactam, And Tazobactam against Clinically Important β -Lactamases. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 1994;(38):767- 72.
12. Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B. Épidémiologie des infections nosocomiales à Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia et Stenotrophomonas maltophilia. Pathol Biol. 2005;53(6):341- 8.
13. Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, Thornley PE, Pattemore PK, Grimwood K. Adaptive resistance to tobramycin in Pseudomonas aeruginosa lung infection in cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother. 1996;37(6):1155- 64.

14. Denis F, Le Hello S, Barraud O. Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies. In: Bactériologie Médicale. Elsevier; 2016. p. 301- 87.
15. Nauciel C, Vildé J-L. Bactériologie médicale. Elsevier Masson; 2005. 369-76.
16. Cheryl A. Nickerson, Ph.D. Arizona State University, http://www.nasa.gov/mission_pages/station/research/experiments/Microbe.htm.
17. Nauciel C, Vildé JL. Bactériologie médicale : connaissance et pratique. 2 ième édition. Paris : Masson, 2007.
18. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):557- 84.
19. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(8):2385- 92.
20. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. 1998;42(2):128- 31.
21. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev. 1995 Oct; 8(4):557-84.
22. Elmeskini K. Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa* [thèse]. Rabat : Université Mohammed V, 2011.
23. Marrakchi CH. Infections à *Acinetobacter*. RevT Un Infect. 2008;2(2):28- 30.
24. Ramadan MA, Tawfik AF, Shibl AM. Effect of Beta-Lactamase Expression on Susceptibility of Local Isolates of *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* Beta-Lactam Antibiotics. Chemotherapy. 1995;41(3):193- 9.
25. EOT-Acinetobacter-Stenotrophomonas.pdf [Internet]. [cité 13 mars 2021]. Disponible sur: http://microbia.free.fr/TS2ABM/Fiches_EOT-TS1/EOT-Acinetobacter-Stenotrophomonas.pdf.
26. Poirel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):755- 8.
27. Corvec S, Caroff N, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Reynaud A. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J Antimicrob Chemother. 2003;52(4):629- 35.
28. Rodríguez-Martínez J-M, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(11):4783- 8.
29. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(4):1252- 6.

30. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5035- 8.
31. Woerther P-L, Angebault C, Lescat M, Ruppé E, Skurnik D, El Mniai A, et al. Emergence and dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: lessons from the study of a remote and controlled population. *J Infect Dis*. 2010;202(4):515- 23.
32. Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet*. 2006;2(1):7.
33. Gupta V, Garg R, Garg S, Chander J, Attri AK. Coexistence of extended spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from burns patients: a report from a tertiary care centre of India. *Ann Burns Fire Disasters*. 2013;26(4):189.
34. Rodriguez-Villalobos H, Struelens M-J. Résistance bactérienne par β -lactamases à spectre étendu: implications pour le réanimateur. *Réanimation*. 2006;15(3):205- 13.
35. Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Trynieszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*—the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(3):257- 67.
36. Bergogne-Berezin E. Current guidelines for the treatment and prevention of nosocomial infections. *Drugs*. 1999;58(1):51- 67.
37. Marchand I, Damier-Piolle L, Courvalin P, Lambert T. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3298- 304.
38. Coignet S. Étude rétrospective des infections à *Pseudomonas luteola* chez le furet. 2014 [cité 5 juin 2021]. Disponible sur:<https://www.google.com>.
39. Meghdas I, Loïez C, Baïda N, Dabboussi F, Hamze M, Husson M-O, et al. Épidémiologie des infections provoquées par les bactéries du «complexe *Burkholderia cepacia*» au cours de la mucoviscidose. *Arch Pédiatrie*. 2004;11(4):360- 6.
40. Tréguet D-A, Aubert H, Henry M, Morange P, Visvikis S, Juhan-Vague I, et al. Combined segregation-linkage analysis of plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) antigen levels with TAFI gene polymorphisms. *Hum Genet*. 2001;109(2):191- 7.
41. Liao C-H, Chang H-T, Lai C-C, Huang Y-T, Hsu M-S, Liu C-Y, et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with *Burkholderia cepacia* bacteremia in an intensive care unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(2):260- 6.
42. Matthaiou DK, Chasou E, Atmatzidis S, Tsolkas P. A case of bacteremia due to *Burkholderia cepacia* in a patient without cystic fibrosis. *Respir Med CME*. 2011;4(3):144- 5.
43. García-Garmendía J-L, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J, Jiménez-Jiménez F-J, Pérez-Paredes C, Barrero-Almodóvar AE, et al. Risk factors for *Acinetobacter baumannii*

- nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clinical infectious diseases*. 2001;33(7):939-46.
44. AsmaLiazid. Etude de la résistance aux antibiotiques des bactéries à Gram négatif non fermentantes au niveau du CHU de Tlemcen. Mémoire de Magister, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen Faculté. 2012;95-53. 2012;
 45. Pragasam A, Vijayakumar S, Bakthavatchalam Y, Kapil A, Das B, Ray P, et al. Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. *Indian journal of medical microbiology*. 2016;34(4):433.
 46. Kamga HG. Caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la ville de Yaoundé (Cameroun). *African Journal of Pathology and Microbiology*. 2015(1).
 47. Ebongue CO, Mefo'o JN, Dongho EN, Moukoko EE, Adiogo D, Beyihabd G. Profil Bactériologique et sensibilité aux antibiotiques des isolats d'hémoculture (2006–2011) à Douala, Cameroun. 2014; *Revue Malienne d'Infectiologie et de Microbiologie*.
 48. Available from: http://www.nosoinfo.be/nosoinfos/principaux-resultats-du-rapport_ears-net-2017/.
 49. Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*. 2018;8(1):31.
 50. Boukadida J, Boukadida N, Elraii S. Bactériologie. *Bull Soc Pathol Exot*. 2002;95(1):8-10.
 51. Chervet D. Infections urinaires en ville: description de la population et épidémiologie actuelle des résistances bactériennes. 2015.
 52. Cholley P, Gbaguidi-Haore H, Bertrand X, Thouverez M, Plésiat P, Hocquet D, et al. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Journal of Hospital Infection*. 2010;76(4):316-9.
 53. Traoré A. Sensibilité aux antibiotiques des souches de *pseudomonas aeruginosa* isolées de 2004 à 2009 au CHU du Point G. 19P101 [PhD Thesis]. [Faculté de pharmacie]: USTTB; 2019.

ANNEXES

10. ANNEXES

Principe

La coloration de Gram est une technique qui permet de classer les bactéries selon la structure de leur paroi en bactéries à Gram positif et à Gram négatif. En effet lorsque les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane et ensuite soumises à l'action du lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout le cytoplasme des bactéries.

Cependant lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seule la paroi des bactéries à Gram négatif, du fait de sa structure particulière (glucido-lipido-protéique) se laisse traversée par l'alcool et entraîne ainsi la décoloration de celles-ci qui seront ultérieurement colorées par la safranine en rouge.

- Technique

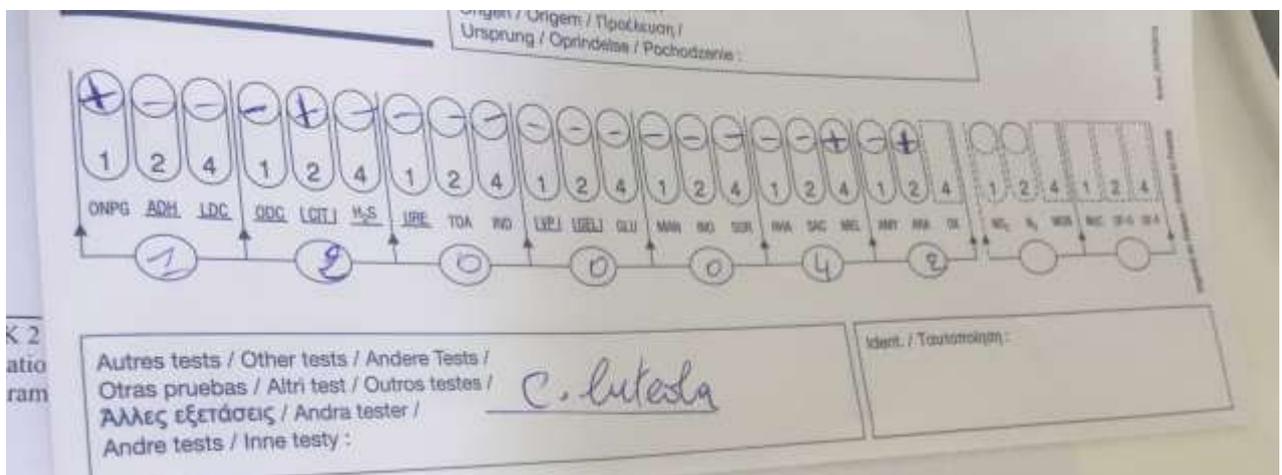
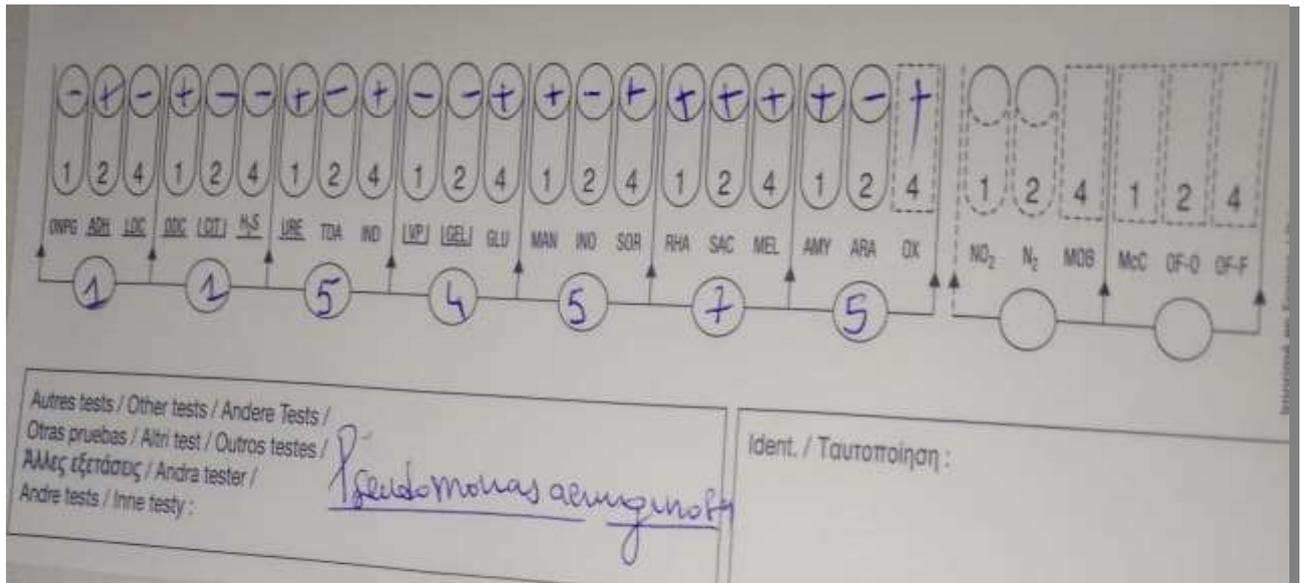
La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

- Fixer le frottis ;
- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet, laissé 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.

- Résultat à la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette.

Etude de la résistance aux antibiotiques des bacilles à gram négatifs non fermentaires dans un laboratoire privé d'analyses biomédicales à Bamako



FICHE D'ENQUETE :

Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles gram négatif non fermentaires isolés au laboratoire Biotech de Bamako sur une période de 12 mois.

Numéro de la fiche : /___/___/___/___/___/___/

Données sociodémographiques :

Age : /___/ ans **Sexe :** /___/ 1=Masculin 2=Féminin

Nationalité : /___/ 1=Maliennne 2=Guinéenne 3=Ivoirienne 4=Burkinabé 5=Autres

Profession : /___/ 1=Cadres 2=Retraité 3=Elève/Etudiant 4=Ouvrier 5=Cultivateur
6=Ménagère 7=Eleveur 8=Commerçant/Vendeur 9= Chauffeur 10= Autres

Résidence : /___/ 1=Commune I 2=Commune II 3=Commune III 4=Commune IV
5=Commune V 6=Commune VI 7=Hors Bamako 8=Autre à préciser :

Statut matrimonial : /___/ 1=Célibataire 2=Marié 3=Divorcé

4=Veuf (ve) 5=Non précisé.

Nature du prélèvement :

A= Vaginale

B= Plaies C= Urines

D= Selles E= Sang F= LCR G= Autres

Bilan d'extension :

✓ Examens demandés :

a- ECBU/___/ b- Pus/___/ c-Hémoculture/___/ d-Liquide d'ascite /___/ e-Expectorations/___/

f- PV/___/ g-LCR/___/ h-Coproculture/___/ i-autres à préciser.....

✓ Conditions de conservation du prélèvement avant analyse

Réfrigérateur /___/ T° Ambiante/___/

✓ Antibiothérapie récente ou en cour chez le patient ? Oui/___/ Non/___/

Si oui quel antibiotique :

❖ **Examens Bactériologique :**

✓ Aspects macroscopiques :

1- Trouble/___/ 2-Non Trouble/___/

✓ Coloration :

1-Jaune/___/2-Clair /___/3-Purulent/___/4-Hématique/___/

5-Autre à préciser :

➤ Aspect microscopique

1- Leucocytes : a- nombreux /___/ b- assez nombreux/___/ c- quelques/ ___/ d- rares/___/

2-Hématies : a- nombreux/___/ b- assez nombreux/___/ c- quelques/___/ d- rares/___/

3-Cellules épithéliales : a- nombreux/___/ b- assez nombreux/___/ c- quelques/___/ d- rares/___/

4-Cristaux : a-présence/___/ b-absence/___/Si présence
lesquels.....

5-Levures : a- présence/___/ b- absence/___/

7-Culture : a- stérile/___/ b- positive/___/

8-Germe :

a-présence/___/ b-absence/___/ si présence, le ou
lequel(s).....

Antibiogramme : /___/ 1=Oui

- **Types d'antibiogramme :** A=CMI B= la méthode des disques

C=Par E-test D= Méthodes automatisées E=Méthode de dilution

F=Autre

Résultat de l'antibiogramme :

Pathogénies	Antibiotiques	Charge	Résistant (R)	Sensible (S)	Intermédiaire (I)
	Acide Nalidixique	5 µg			
	Gentamicine	10 µg			
	Ofloxacin				
	Cotrimoxazole				
	Cefalotine				
	Ciprofloxacine				
	Ceftriaxone				
	Amoxicilline+Acide clavulanique				
	Ampicilline				
	Ticarcilline				
	Ceftazidime				
	Amikacine				
	Imipenème				

Phénotype de résistance retrouvé :

.....

FICHE SIGNALÉTIQUE :

Nom : Touré

Prénom : Alassane Mahamane

TEL : (00223) 73 10 49 73 / 64 56 14 62

Adresse : E-mail : tourealhassane721@gmail.com

Année universitaire : 2020-2021

Pays : Mali

Titre de thèse : Etude de la résistance aux antibiotiques des bacilles à gram négatifs non fermentaires dans un laboratoire privé d'analyses biomédicales à Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de pharmacie (FAPH)

Secteur d'intérêt : Bactériologie, Santé publique

Introduction : La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, qui nécessite une attention particulière, en particulier chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Ce travail est une étude prospective portant sur les patients venus avec une demande d'examen bactériologiques au laboratoire Biotech à fin d'évaluer le profil de résistance.

Objectif : Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches des bacilles à Gram négatif non fermentaires isolées de mars 2020 à mars 2021 au laboratoire Biotech de Bamako.

Méthodologie : Toutes les souches bactériennes de bacilles à Gram négatifs non fermentaires isolées des prélèvements de patients ont été collectées. Pour l'étude bactériologique et d'antibiogramme nous avons utilisé les méthodes conventionnelles respectant les recommandations du CASFM 2020. L'analyse des résultats a été effectuée par SPSS version 19.0.

Résultats : *Pseudomonas spp* était l'espèce la plus fréquemment isolée avec 43,5%, suivie d'*A. baumannii* avec 32,6%. *B. cepacia* était l'espèce la moins fréquente avec 2,2%. L'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques a révélé une résistance très élevée à la ticarcilline, à l'association piperacilline/tazobactam et aux fluoroquinolones. Les phénotypes céphalosporinase hyperproduite pour les bêta-lactamines et le phénotype sauvage pour les aminosides étaient les phénotypes les plus fréquents.

Conclusion : *Pseudomonas spp* et *A. baumannii* sont les bactéries à Gram négatif non fermentaires les plus fréquemment isolées chez les patients venus au laboratoire BIOTECH ; Ces souches étaient particulièrement résistantes à la ticarcilline, à l'association piperacilline/tazobactam et aux fluoroquinolones.

Mots clés : BGNnF ; Résistance, Biotech, Mali.

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.