

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



Faculté de Pharmacie
(FAPH)



THÈSE

N°-----/

Pour obtenir le Grade de Docteur en Pharmacie
(DIPLOME D'ETAT)
Présentée et soutenue publiquement le //2018

**SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS
DES SOUCHES D'*ESCHERICHIA COLI* ISOLEES AU
LABORATOIRE RODOLPHE MERIEUX DE 2016 à 2017 à
BAMAKO/MALI**

Par

Mlle Aminata DEMBELE

Devant le jury de la Faculté de Pharmacie

Jury

Président: Pr Flabou BOUGOUDOGO

Membre : Pr Sounkalo DAO

Membre: Dr Lassana Gadi TIMBINE

Co-directeur: Dr Ibréhima GUINDO

Directeur : Pr Souleymane DIALLO

Année Universitaire : 2017-2018

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2017-2018

ADMINISTRATION

DOYEN : M. Boubacar TRAORE - Professeur

VICE-DOYEN : M. Ababacar I. MAIGA - Professeur

SECRETAIRE PRINCIPAL : M. Seydou COULIBALY Administrateur civil

AGENT COMPTABLE : M. Famalé DIONSAN Contrôleur des finances

PROFESSEURS HONORAIRES

| | | |
|---------------------|----------|----------------------------|
| M. Boubacar Sidiki | CISSE | Toxicologie |
| M. Mahamadou | CISSE | Biologie |
| M. Daouda | DIALLO | Chimie générale & minérale |
| M. Kaourou | DOUCOURE | Physiologie |
| M. Boulkassoum | H Aidara | Législation |
| M. Moussa | HARAMA | Chimie organique (décédé) |
| M. Gaoussou | KANOUTE | Chimie Organique |
| M. Alou A | KEITA | Galénique |
| M. Mamadou | KONE | Physiologie |
| M. Mamadou | KOUMARE | Pharmacognosie |
| M. Brehima | KOUMARE | Bactériologie/Virologie |
| M. Abdourahamane S. | MAIGA | Parasitologie |
| M. Elimane | MARIKO | Pharmacologie |

DER DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET MEDICALES

1. PROFESSEURS/DIRECTEUR DE RECHERCHE

| | | |
|--------------|--------|-------------------------|
| M. Mounirou | BABY | Hématologie |
| M. Bakary M. | CISSE | Biochimie |
| M. Abdoulaye | DABO | Biologie/parasitologie |
| M. Amagana | DOLO | Parasitologie-Mycologie |
| M. Alassane | DICKO | Santé Publique |
| M. Boubacar | TRAORE | Parasitologie-Mycologie |

2. MAITRES DE CONFERENCES/MAITRES DE RECHERCHE

| | | |
|---------------|------------|------------------------------------|
| M. Flabou | BOUGOUDOGO | Bactériologie-Virologie |
| M. Mahamadou | DIAKITE | Immunologie |
| M. Souleymane | DIALLO | Bactériologie-Virologie |
| M. Abdoulaye | TOURE | Entomologie Moléculaire-Médicale |
| M. Abdoulaye | DJIMDE | Microbiologie-Immunologie |
| M. Akory AG | IKNANE | Santé publique/Nutrition |
| M. Ousmane | KOITA | Parasitologie-Moléculaire |
| M. Bourèma | KOURIBA | Immunologie Chef de DER |
| M. Ousmane | TOURE | Santé Publique/Santé environnement |

3. MAITRES ASSISTANTS/CHARGES DE RECHERCHE

| | | |
|------------------|---------|-------------|
| M. Charles | ARAMA | Immunologie |
| M. Seydina S. A. | DIAKITE | Immunologie |

| | | |
|----------------------|---------|------------------------------------|
| M. Aldjouma | GUINDO | Hématologie |
| M. Ibrehima | GUINDO | Bactériologie virologie |
| M. Kassoum | KAENTAO | Santé Publique/Bio statistiques |
| M. Issaka | SAGARA | Santé Publique/Bio statistiques |
| Mme Fanta | SANGHO | Santé Publique/Santé communautaire |
| M. Mahamadou Soumana | SISSOKO | Santé Publique/Bio statistiques |

4. ASSISTANTS/ATTACHE DE RECHERCHE

| | | |
|------------------------|-----------|------------------------------------|
| M. Seydou Saaou | COULIBALY | Biochimie clinique |
| Mme Djénéba | COULIBALY | Nutrition/Diététique |
| M. Djibril Mamadou | COULIBALY | Biochimie clinique |
| Mme Djénéba Koumba | DABITAO | Biologie moléculaire |
| M. Souleymane | DAMA | Parasitologie Entomologie méd |
| M. Laurent | DEMBELE | Biotechnologie Microbienne |
| M. Klétigui Casimir | DEMBELE | Biochimie Clinique |
| M. Issa | DIARRA | Immunologie |
| Mme Fatou | DIAWARA | Epidémiologie |
| M.Yaya | GOITA | Biochimie clinique |
| Mme Merepen dit Agnes | GUINDO | Immunologie |
| M. Oumar | GUINDO | Epidémiologie |
| M. Falaye | KEITA | Santé publique/Santé environnement |
| Mme.N'Deye Lallah Nina | KOITA | Nutrition |
| M. Birama Apho | LY | Santé publique |
| M. yacouba | MAIGA | Bio statistique |
| M. Amadou Birama | NIANGALY | Parasitologie-Mycologie |
| Mme. Dinkorma | OULOQUEM | Biologie Cellulaire |
| M. Samba Adama | SANGARE | Bactériologie |
| M. Oumar | SANGHO | Epidémiologie |
| M. Djakaridia | TRAORE | Hématologie |

DER DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

1. PROFESSEURS/ DIRECTEUR DE RECHERCHE

| | | |
|-----------|--------|-----------------------------------|
| M. Drissa | DIALLO | Pharmacognosie |
| M. Saibou | MAIGA | Législation |
| Mme Rokia | SANOGO | Pharmacognosie Chef de DER |

2. MAITRE DE CONFERENCES/ MAITRE DE RECHERCHE

Néant

-

-

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGES DE RECHERCHE

| | | |
|---------------|-----------|------------------------|
| M. Loséni | BENGALY | Pharmacie Hospitalière |
| M. Moussa | SANOGO | Gestion |
| M. Yaya | COULIBALY | Législation |
| Mme Adiaratou | TOGOLA | Pharmacognosie |

4. ASSISTANTS/ ATTACHES DE RECHERCHE

| | | |
|-------------------|-----------|------------------------|
| M. Bakary Moussa | CISSE | Galénique |
| M. Issa | COULIBALY | Gestion |
| M. Balla Fatogoma | COULIBALY | Pharmacie hospitalière |
| M. Seydou Lahaye | COULIBALY | Gestion pharmaceutique |

| | | |
|------------------------|---------|--------------------------|
| M. Antoine | DARA | Sciences pharmaceutiques |
| M. Daouda Lassine | DEMBELE | Pharmacognosie |
| M. Adama | DENOU | Pharmacognosie |
| M. Sekou | DOUMBIA | Pharmacognosie |
| M. Mahamane | HAIDARA | Pharmacognosie |
| Mme. Assitan | KALOGA | Législation |
| M. Hamma Boubacar | MAIGA | Galénique |
| M. Ahmed | MAIGA | Législation |
| Mme. Aichata Ben Adam | MARIKO | Galénique |
| M. Aboubacar | SANGHO | Législation |
| M. Bourama | TRAORE | Législation |
| M. Karim | TRAORE | Sciences pharmaceutiques |
| M. Sylvestre | TRAORE | Gestion pharmaceutique |
| Mme. Aminata Tiéba | TRAORE | Pharmacie hospitalière |
| M. Mohamed dit Sarmoye | TRAORE | Pharmacie hospitalière |

DER DES SCIENCES DU MEDICAMENT

1. PROFESSEURS / DIRECTEUR DE RECHERCHE

| | | |
|----------------|---------|--------------------|
| M. Ousmane | DOUMBIA | Pharmacie chimique |
| M. Ababacar I. | MAIGA | Toxicologie |

2. MAITRES DE CONFERENCES/ MAITRES DE RECHERCHE

| | | |
|-------------------|---------|----------------------------------|
| M. Sékou | BAH | Pharmacologie Chef de DER |
| M. Benoit Yaranga | KOUMARE | Chimie Analytique |

3. MAITRES ASSISTANTS/ CHARGES DE RECHERCHE

| | | |
|---------------------|--------|--------------------|
| M. Dominique patomo | ARAMA | Pharmacie chimique |
| M. Tidiane | DIALLO | Toxicologie |

4. ASSISTANTS/ ATTACHES DE RECHERCHE

| | | |
|---------------------------|-----------|----------------------|
| M. Mahamadou | BALLO | Pharmacologie |
| M. Mody | CISSE | Chimie thérapeutique |
| M. Dalaye Bernadette | COULIBALY | Chimie analytique |
| M. Blaise | DACKOOU | Chimie Analytique |
| Mme. Fatoumata | DAOU | Pharmacologie |
| M. Ousmane | DEMBELE | Chimie thérapeutique |
| M. Abdourahamane | DIARA | Toxicologie |
| M. Aiguerou dit Abdoulaye | GUINDO | Pharmacologie |
| M. Madani | MARIKO | Chimie Analytique |
| M. Mohamed El Béchir | NACO | Chimie Analytique |
| M. Mahamadou | TANDIA | Chimie Analytique |
| M. Dougoutigui | TANGARA | Chimie Analytique |
| M. Hamadoun Abba | TOURE | Bromatologie |

Dédicaces

A mon père Général Adama DEMBELE

Homme intègre, humble, affectueux, serviable, homme de principe mais surtout un père de famille hors du commun. Tu es pour moi une véritable source d'inspiration et, par ta présence, tu as toujours su trouver ce qu'il fallait et quand il le fallait pour me stimuler vers le sommet. Ta grandeur est sans équivoque Général, tu es le véritable artisan de l'œuvre Aminata Dembélé.

Je prie pour que le Bon Dieu te garde longtemps auprès de tes enfants qui ne peuvent être encore plus fiers.

A ma mère Aoua KEITA

Tout d'abord je te demande pardon pour toutes les fois où j'ai eu à t'offenser

Educatrice non pas uniquement par la profession, tes qualités de femme respectable et respectueuse, digne, d'épouse exceptionnelle au-delà de toute attente et de surcroît, de mère à la générosité incommensurable, font que ce travail est le modeste témoignage de toute la gratitude qui te revient. Puisses-tu en être fière.

Merci pour ton amour, ton encouragement, tes prières ainsi que tes bénédictions

Merci pour les sacrifices consentis

Puisse Dieu te donner longue vie pour savourer les fruits de ton labeur.

A mes frères et sœurs DEMBELE

Oumar, Ibrahima, Moussa, Alimata, Kadiatou, Molobaly dit Mahamadou, Abdoulaye

Pour leur encouragement, leur soutien, leur tendresse mais par-dessus tout pour leur sens inouï d'esprit de famille. Que Dieu vous bénisse.

A feu Dr Oumar KALIFA

Qu'ALLAH dans sa miséricorde t'accorde le repos éternel.

Remerciements

Je rends grâce

A **ALLAH**, le Tout-Puissant, le Tout Miséricordieux, le Clément, l'Unique pour m'avoir donné la santé et le courage nécessaire pour venir à bout de ce travail

Au PROPHETE MOHAMED « Paix et Salut sur lui »

Que votre bénédiction et votre assistance soient sur nous tous.

A mes tontons, tanties, à toute ma famille

Merci pour vos conseils et bénédictions sincères.

A ma maman Mariam SIDIBE

Tu es l'incarnation de la bonté, de la générosité et de l'amour

Tu m'as acceptée, considérée et aimée comme ta propre fille, puisse Dieu te le rendre au centuple

Merci d'être toujours là pour nous et de nous pousser à toujours donné le meilleur de nous-même, merci pour tout Maman Jolie et que Dieu te donne longue vie pour jouir pleinement de tout ce dont tu souhaites dans la vie.

A mes amis (es) « Ma famille »

Térédjou Fatou SANOGO, Arkiétou MAIGA, Saran KONATE, Mahady SISSOKO, Barassé COULIBALY, Hamidou CISSE

Vous qui m'avez supportée durant toutes ces années, dans la santé comme dans la maladie, aucun mot ne saurait exprimer toute la reconnaissance que j'ai à votre égard

Merci à vous d'avoir été toujours présents pour moi, de m'avoir acceptée et aimée telle que je fus, longue vie à vous

Ce travail vous appartient.

Au personnel du Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM)

Apprendre à vos côtés a été une de mes expériences les plus fructueuses. Merci pour votre accueil et votre motivation à mon service.

À mes camarades du LRM

Ce fut un réel plaisir de partager tous ces moments avec vous. Merci pour votre solidarité, votre gentillesse et bonne suite à nous tous.

Au professeur Colonel Major Elimane MARICO

Merci pour votre soutien indéfectible durant ces longues années. Votre bonté et votre gentillesse définisse à juste titre votre réputation. Qu'Allah vous les retourne en bien.

À la pharmacie BAZI GOURMA

Merci de m'avoir acceptée dans votre prestigieuse officine pour si longtemps, merci pour votre humilité et pour tout le savoir transmis de façon désintéressée.

À la pharmacie Sidy BOUKENEM

Apprendre à vos côtés m'inspirera tout le long de ma carrière professionnelle.

A tout le corps professoral de la FMOS et FAPH

Pour la qualité de votre enseignement, de votre encadrement et pour votre disponibilité, recevez ici l'expression de mon profond respect.

A mes camarades de l'Ecole MGR Fernand Sauvart, du Lycée Notre Dame du Niger et à tous mes camarades de la promotion N'Golo DIARRA

Merci pour tout et bonne carrière professionnelle à tous. Qu'Allah nous assiste.

Aux Docteurs

Alhadji DICKO et Mahamane Haidara

Merci pour vos conseils, votre disponibilité, votre générosité et votre soutien sans faille. Qu'ALLAH vous récompense.

A tous ceux qui de près ou de loin ont conduit à la finalité de ce travail

Recevez ici toute l'expression de ma profonde gratitude.

Hommage Aux Membres Du Jury

A notre maître et président du jury : Pr Flabou BOUGOUDOGO

- ✓ **Pharmacien microbiologiste**
- ✓ **Maître de Conférences Agrégé en Bactériologie et Virologie à la Faculté de Pharmacie**
- ✓ **Directeur de l'Institut National de Recherche en Santé publique (2005-2012)**
- ✓ **Chevalier de l'Ordre du Mérite de la Santé**

Cher Maître

Vous nous faites un grand honneur en acceptant la présidence de notre jury de thèse

Votre simplicité et votre modestie, votre rigueur scientifique et votre dévouement pour le travail bien fait font de vous un MAITRE exemplaire, de renommé international et de surcroit, apprécié de tous

Recevez cher maître, notre profond respect et toutes mes reconnaissances.

A notre maître et juge : Pr Sounkalo DAO

- ✓ **Professeur titulaire de Maladies Infectieuses et tropicales ;**
- ✓ **Chef de DER en médecine à la FMOS ;**
- ✓ **Responsable de l'enseignement des Maladies Infectieuses à la FMOS ;**
- ✓ **Investigateur clinique au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose : SEREFO/FMOS/NIAD ;**
- ✓ **Président de la Société Malienne des Pathologies Infectieuses et Tropicales (SOMAPIT).**

Cher Maître

Nous avons été impressionnés par la promptitude et la modestie avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail malgré vos multiples sollicitations

Votre dévouement, votre rigueur scientifique et votre sens élevé de la personnalité humaine font de vous un exemple à suivre

Veillez accepter cher Maître, nos sentiments d'estime et de profond respect.

A notre maitre et juge : Dr Lassana Gadi TIMBINE

✓ **Pharmacien Biologiste**

✓ **Directeur de laboratoire du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM)**

Cher Maître

C'est un grand honneur et un réel plaisir de vous avoir parmi nos membres du jury.

Votre bonne collaboration avec les étudiants, votre humilité et votre attention ne nous ont pas laissés indifférents et font de vous une référence scientifique.

Veillez agréer cher MAITRE, l'expression de notre profonde gratitude et soyez assuré de nos sentiments de sincères remerciements.

A notre maitre et co-directeur de thèse : Dr Ibréhima GUINDO

- ✓ **Pharmacien biologiste,**
- ✓ **Chef de service du laboratoire de Bactériologie-Virologie à l'INRSP**
- ✓ **Maitre-assistant de Bactériologie Virologie à la Faculté de Pharmacie**

Cher Maître

Nous ne pouvons pas être plus fiers de vous avoir comme co-directeur

Au-delà de votre engagement dans la recherche scientifique, de vos qualités pédagogiques, de votre dévouement pour le travail bien fait, de votre disponibilité constante et de vos riches conseils, vous êtes la preuve que le partage de la bonne humeur, du respect mutuel et de la générosité est gage du rehaussement de la culture de l'excellence

Veillez accepter cher MAITRE, le témoignage de notre profond respect, de notre sincère gratitude et de nos remerciements les mieux exprimés.

À notre maître et directeur de thèse : Pr Souleymane DIALLO

- ✓ **Pharmacien biologiste,**
- ✓ **Colonel Major à la retraite (Service de Santé des Armées)**
- ✓ **Professeur de Bactériologie et Virologie,**
- ✓ **Directeur Général du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux, Mali (2012-2017)**

Cher Maître

Vous nous avez fait un grand honneur en nous acceptant dans votre SERVICE et cela, avec la plus grande amabilité qui soit. Soyez en remercié

Votre simplicité, votre générosité, votre culture scientifique et votre ouverture envers les étudiants, font de vous un homme remarquable et un professeur exemplaire

Sans vos sages conseils, votre disponibilité, votre patience et votre encadrement à hauteur de souhait, ce travail n'aurait pas vu le jour

Veillez agréer honorable MAITRE, l'assurance de notre profonde reconnaissance.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Table des matières | 12 |
| Liste des tableaux | 18 |
| Liste des figures..... | 19 |
| INTRODUCTION | 20 |
| Objectifs | 22 |
| 1.1 Objectif général | 22 |
| 1.2 Objectifs spécifiques..... | 22 |
| Chapitre 1 : Généralités | 23 |
| 1.1 Famille des Enterobacteriaceae | 23 |
| 1.1.1 Définition et classification..... | 23 |
| 1.1.2 Habitat | 24 |
| 1.1.3 Caractères cultureux | 24 |
| 1.1.4 Caractères antigéniques | 25 |
| 1.1.4.1 Les antigènes O | 25 |
| 1.1.4.2 Les antigènes H | 25 |
| 1.1.4.3 Les antigènes K | 25 |
| 1.1.4.4 Les antigènes kunin | 26 |
| 1.1.5 Pouvoir pathogène naturel | 26 |
| 1.1.6 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques | 26 |
| 1.1.6.1 Résistance aux Bêta-lactamines..... | 27 |
| 1.1.6.1.1 Résistance naturelle et phénotypes « sauvages »..... | 27 |
| 1.1.6.1.2 Résistance acquise et phénotypes de résistances | 29 |
| 1.1.6.2 Résistance aux aminosides | 31 |
| 1.1.6.3 Résistance aux quinolones..... | 31 |
| 1.1.6.4 Phénotype de résistance des entérobactéries aux quinolones | 32 |
| 1.1.6.5 Résistance aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à gram négatifs..... | 32 |
| 1.1.7 Conservation des souches | 32 |
| 1.1.7.1 Principes généraux..... | 33 |
| 1.1.7.2 Moyens de conservation | 33 |
| 1.1.7.2.1 Conservation de courte durée (quelques jours à quelques semaines)..... | 33 |
| 1.1.7.2.2 Conservation de moyenne durée (quelques mois) | 34 |
| 1.1.7.2.3 Conservation de longue durée (plusieurs années)..... | 34 |
| 1.2 <i>Escherichia coli</i> | 35 |
| 1.2.1 Aperçu Historique..... | 35 |
| 1.2.2 Définition et classification..... | 35 |
| 1.2.3 Caractères Bactériologiques | 35 |
| 1.2.3.1 Souches typiques de <i>E. coli</i> | 35 |
| 1.2.3.2 Souches atypiques de <i>E. coli</i> | 36 |
| 1.2.4 Propriétés antigéniques..... | 37 |

| | | |
|---|--|----|
| 1.2.5 | Habitat, pouvoirs pathogène naturels et facteurs de pathogénicité..... | 39 |
| 1.2.6 | Pathovars d' <i>E. coli</i> | 39 |
| 1.2.6.1 | <i>E. coli</i> Enteropathogène (ECEP, « Enteropathogenic <i>E. coli</i> » ou EPEC)..... | 40 |
| 1.2.6.2 | <i>E. coli</i> entérotoxigène (ECET, « Enterotoxinogenic <i>E. coli</i> » ou ETEC)..... | 41 |
| 1.2.6.3 | <i>E. coli</i> entéroinvasif (ECEI « Enteroinvasive <i>E. coli</i> » ou EIEC)..... | 42 |
| 1.2.6.4 | <i>E.coli</i> entérohémorragiques (ECEH « Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> » ou EHEC)..... | 42 |
| 1.2.6.5 | <i>E. coli</i> Entéroagrégatif (ECEAg, « Enteroaggregative <i>E.coli</i> » ou EAEC)..... | 44 |
| 1.2.6.6 | <i>E. coli</i> à adhésion diffuse (ECAD), « Diffusely-adhering <i>E. coli</i> » ou DAEC)..... | 44 |
| 1.2.7 | Résistance aux antimicrobiens..... | 47 |
| Chapitre 2 : Matériel et Méthodes | | 49 |
| 1.3 | Matériel et réactifs..... | 49 |
| 1.3.1 | Matériel d'analyse de laboratoire | 49 |
| 1.3.2 | Milieux et Réactifs..... | 49 |
| 1.3.2.1 | Types de prélèvement..... | 50 |
| 1.3.2.1.1 | Prélèvement des urines | 50 |
| 1.3.2.1.2 | Prélèvement des pus | 50 |
| 1.3.2.1.3 | Prélèvement des liquides d'ascite..... | 50 |
| 1.3.2.1.4 | Prélèvement des hémocultures | 50 |
| 1.3.2.1.5 | Prélèvement urétral..... | 50 |
| 1.4 | Matériel et Méthodes | 50 |
| 1.4.1 | Cadre d'étude..... | 50 |
| 1.4.2 | Type d'étude..... | 51 |
| 1.4.3 | Période d'étude..... | 52 |
| 1.4.4 | Population d'étude..... | 52 |
| 1.4.5 | Echantillonnage | 52 |
| 1.4.6 | Critère d'inclusion | 52 |
| 1.4.7 | Critère de non inclusion..... | 52 |
| 1.4.8 | Souches étudiées..... | 52 |
| 1.4.9 | Etude microbiologique | 52 |
| 1.4.9.1 | Examen macroscopique..... | 52 |
| 1.4.9.2 | Examen microscopique..... | 52 |
| 1.4.9.3 | Culture | 53 |
| 1.4.9.3.1 | Gelose uriselect4..... | 54 |
| 1.4.9.3.2 | Gelose Drigalski | 54 |
| 1.4.10 | Test de sensibilité aux antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby-Bauer | 56 |
| 1.4.11 | Tests de détection des bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE)..... | 57 |
| 1.4.12 | Variables étudiées..... | 58 |
| 1.4.12.1 | Collecte de données | 58 |
| 1.4.12.2 | Analyses et traitement des données | 59 |

| | |
|-----------------------|----|
| Résultats | 60 |
| Discussion..... | 69 |
| Conclusion..... | 72 |
| Recommandations | 73 |
| Références | 74 |
| Annexes | 77 |

Sigles et abréviations

| | |
|-----------------|---|
| µm : | Micromètre |
| AAF : | Aggregative Adherence Fimbriae |
| ADH : | Arginine décarboxylase |
| AKN : | Amikacine |
| AMC : | Amoxilline-Acide clavulanique |
| AMX : | Amoxilline |
| BFP : | Bundle Formin Pili |
| BGN : | Bactérie à Gram Négatif |
| BLSE : | Bêta-lactamase à Spectre Etendu |
| BPO : | Bactéries pathogènes opportunistes |
| BPS : | Bactéries pathogènes spécifiques |
| C1G : | Cephalosporine de 1ère génération |
| C2G : | Cephalosporine de 2ème génération |
| C3G : | Cephalosporine de 3ème génération |
| C4G : | Cephalosporine de 4ème génération |
| CASE : | Céphalosporinase |
| CA-SFM : | Comité d'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie |
| CAZ : | Ceftazidine |
| CDC : | Centre De Contrôle |
| CEA : | Carcino Embryonic Antigen |
| CEF : | Cefotaxime |
| CFA/1 : | Colonization Factor Antigen 1 |
| CFT : | Cefalotine |
| CICM : | Centre d'Infectiologies Charles Mérieux |
| CIP : | Ciprofloxacine |
| CMI : | Concentration minimale inhibitrice |
| CS : | Coli Surface |
| CTX : | Cefotaxime |
| DAEC : | Diffusely-Adhering <i>E. coli</i> |
| DAF : | Decay Accelerating Factor |
| Eae : | <i>Escherichia coli</i> Attaching Effacing |
| EAEC : | Enteraggregative <i>E. coli</i> |
| EAF : | <i>Escherichia coli</i> enteropathogène Adherence Factor |
| EAST : | Enteraggregative <i>E. coli</i> heat Stable Enterotoxin |
| ECAD : | <i>E. coli</i> à adhésion diffuse |
| ECBU : | Examen Cytobactériologique des Urines |
| ECDC : | Centre Européen de Contrôle |
| ECEAG : | <i>E. coli</i> Entéroagrégatif |
| ECEH : | <i>E. Coli</i> entérohémorragiques |
| ECEI : | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasif |
| ECET : | Enterotoxigenic <i>E.coli</i> |
| EHEC : | Enterohemorrhagic <i>E. coli</i> |

| | |
|--------------------|---|
| EIEC : | Enteroinvasif <i>E.coli</i> |
| EPEC : | <i>Escherichia coli</i> enteropathogène |
| Esp : | <i>Escherichia coli</i> Secreted Proteins |
| ETEC : | <i>Escherichia coli</i> enterotoxinogène |
| FAST-Test : | Fluorescence Actin Staining |
| FOS : | Fosfomycine |
| G+C : | Guanine + Cytosine |
| GEN : | Gentamicine |
| IMI : | Imipenème |
| IPA : | Invasion Plasmidique Antigens |
| K : | Kanamicine |
| KES : | <i>Klebsiella, Enterobacter, Serratia</i> |
| LDC : | Lysine décarboxylase |
| LEE : | Locus of Enterocyte Effacement |
| LER : | Locus of enterocyte Efacement-Endocoded Regulator Mapkinases-Mitogen-Activated-Proteinkinases |
| LPS : | Lipopolysacharides |
| LRM : | Laboratoire Rodolphe Mérieux |
| LT : | Toxine Thermolabile |
| MAP : | Membrane Associated Protein |
| Mm : | Millimètre |
| MRHA : | Hemaglutination resistant au mannose |
| MSHA : | Hemaglutination sensible au mannose |
| NAL : | Norfloxacin |
| ND : | Non Déterminé |
| NITRO : | Nitrofurantoine |
| NOR : | Norfloxacin |
| O157 STEC : | Shiga Toxine-producing <i>Escherichia coli</i> |
| ODC : | Ornithine décarboxylase |
| OMS : | Organisation mondiale de la santé |
| ONPG : | Orthonitrophényl- β -galactoside |
| P.Sauvage : | Phénotype Sauvage |
| PBN : | Pénicillinase Bas Niveau |
| PHN : | Pénicillinase Haut Niveau |
| PTT : | Purpura Thrombotique Thrombopénique |
| SHU : | Syndrome Hémorragiques et Urémiques |
| SLT : | Shiga-Like |
| ST : | Toxine Thermostable |
| STX : | Shigatoxines |
| TIC : | Ticarcilline |
| TIR : | Translocate Intimin Receptor |
| TOB : | Tobramycine |
| TRI : | Terme Résistant aux Inhibiteurs |
| TSU : | Sulfaméthoxazole-Triméthoprime |
| TTSS : | Type Three Secretion System |

VP : Vogues proskauer
VT : Verotoxines
VTEC : *E. coli* producteurs de verotoxines

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (12). | 24 |
| Tableau II : Caractères biochimiques différentiels des principales espèces du genre <i>Escherichia coli</i> (19)..... | 39 |
| Tableau III : Principales infections dues à <i>E. coli</i> | 45 |
| Tableau IV : Caractéristiques des différents pathovars d' <i>Escherichia coli</i> responsables de diarrhées (22)..... | 46 |
| Tableau V : Attitude des entérobactéries vis-à-vis des bêta-lactamines | 31 |
| Tableau VI : Phénotype de résistance aux quinolones..... | 32 |
| Tableau VII : Répartition des souches selon le genre de 2016 à 2017..... | 61 |
| Tableau VIII : Répartition des 197 souches d' <i>E.coli</i> selon l'origine du prélèvement | 62 |
| Tableau IX : Répartition du sexe en fonction du type de prélèvement | 63 |
| Tableau X : Répartition des souches d' <i>Escherichia coli</i> selon la période..... | 63 |
| Tableau XI : Fréquence de la résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux antibiotiques testés..... | 64 |
| Tableau XII : Répartition des betalactamases selon les types de prélèvements..... | 67 |
| Tableau XIII : Répartition des betalactamases selon la structure de santé | 68 |
| Tableau XIV : Les phénotypes de résistance d' <i>E. coli</i> aux quinolones | 68 |
| Tableau XV : Phénotypes de résistances des ND..... | 68 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Colonies d' <i>Escherichia coli</i> , grossissement 10000 (18)..... | 37 |
| Figure 2 : <i>Escherichia coli</i> après coloration de Gram-Wikipédia (24)..... | 53 |
| Figure 3 : Aspect des colonies d' <i>Escherichia coli</i> sur Uriselect4..... | 54 |
| Figure 4 : Aspect des colonies d' <i>Escherichia coli</i> sur Drigalski..... | 55 |
| Figure 5 : L'automate VITEK® 2 compact..... | 56 |
| Figure 6 : Un antibiogramme | 57 |
| Figure 7 : <i>Escherichia coli</i> BLSE (Image du bouchon de champagne) | 58 |
| Figure 8 : Répartition globale des bactéries isolées et identifiées | 60 |
| Figure 9 : Pourcentage des souches de E. coli par rapport aux autres entérobactéries | 61 |
| Figure 10 : Répartition des 197 souches d'E. coli selon le type de prélèvement..... | 62 |
| Figure 12 : Fréquence de résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux betalactamines | 65 |
| Figure 13 : Fréquence de résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux aminosides..... | 65 |
| Figure 14 : Fréquence de résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux quinolones | 66 |
| Figure 15 : Phénotypes de résistances aux bêtalactamines..... | 67 |

INTRODUCTION

On parle de résistance aux antimicrobiens lorsque des micro-organismes (bactéries, virus, champignons et parasites) acquièrent une résistance à un médicament antimicrobien auquel ils étaient auparavant sensibles (1). En effet, les antibiotiques agissent non seulement sur la bactérie responsable de l'infection à traiter, mais également, pour la majorité d'entre eux, sur les bactéries utiles et non pathogènes de notre organisme et de l'environnement. Toutes les bactéries sont ainsi susceptibles d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques, en complément de ceux que certaines d'entre elles possèdent naturellement (2).

Lorsque les microbes résistent aux médicaments, les options dont on dispose pour traiter les maladies qu'ils provoquent deviennent plus limitées (3). Or la résistance aux antimicrobiens d'un large éventail d'agents infectieux est devenue très préoccupante pour les pays et de nombreux secteurs d'activités. Elle représente ainsi une menace croissante pour la santé publique. Il est particulièrement alarmant de constater la propagation rapide, dans le monde entier, de bactéries multirésistantes susceptibles de provoquer des infections courantes non sensibles au traitement par les antimicrobiens existants (1).

En Europe, le Centre européen de contrôle des maladies (ECDC) évalue à 25 000 par an le nombre de décès résultant de la résistance aux antibiotiques. Une surmortalité équivalente est observée aux Etats Unis par le CDC d'Atlanta (4). Les données manquent pour les pays à bas revenu, mais l'augmentation de la résistance dans ces pays, associée au manque d'accès à des antibiotiques sûrs lorsqu'ils sont nécessaires, est probablement responsable de très nombreux décès (4).

La surveillance est la pierre angulaire de tout effort visant à évaluer la charge de la résistance aux antimicrobiens et à recueillir les informations nécessaires à la mise en œuvre de stratégies locales, nationales et mondiales (1). Toutefois, les normes proposées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour la collecte et la communication des données relatives à la résistance aux antimicrobiens dans le domaine de la santé humaine ne sont pas encore appliquées à grande échelle. Il n'existe actuellement aucun forum mondial permettant le partage rapide d'informations normalisées sur la résistance aux antimicrobiens (1).

Cependant cette résistance aux antimicrobiens est en perpétuelle évolution et se fait surtout remarquer chez différentes espèces d'entérobactéries au cours des deux dernières décennies. La résistance des entérobactéries aux antibiotiques connaît une évolution mondiale préoccupante avec un impact croissant des betalactamases à spectre élargi (BLSE) qui diffusent notamment dans le secteur communautaire responsable d'une résistance à presque toutes les pénicillines et céphalosporines. Dans 2/3 des cas, s'y associe une résistance aux quinolones et au cotrimoxazole (5).

Escherichia coli est l'une des causes les plus fréquentes de bactériémies et des infections des voies urinaires communautaires et nosocomiales à travers le monde (6). Au Mali, *Escherichia coli* a été responsable des épidémies de diarrhées infantiles à Bamako en 1985. Parmi les études les plus récentes faites sur les diarrhées et les infections urinaires on relève respectivement une fréquence d'*Escherichia coli* à 43,9% et 45,3% (7). La résistance aux antibiotiques chez *E. coli* doit être particulièrement surveillée car les pourcentages de souches isolées résistantes aux antibiotiques les plus courants continuent d'augmenter.

L'augmentation de la résistance aux betalacamines, aux céphalosporines de troisième génération, et la résistance combinée aux fluoroquinolones et aux aminosides sont particulièrement préoccupantes.

La résistance d'*Escherichia coli* aux fluoroquinolones au Maroc a considérablement augmenté, passant de 10% en 2005 à 75% en 2012 (8).

Selon une étude européenne, la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) chez *E. coli* en Etablissement de santé a régulièrement augmenté de 1,4 % en 2005 à 11,9 % en 2015 parmi les souches isolées d'infections invasives (9). Pour l'OMS, la résistance aux antimicrobiens constitue aujourd'hui l'une des plus grandes menaces pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement.

La présente recherche qui se déroulera au LRM, Bamako, se propose d'étudier le cas malien dans la période allant de janvier 2016 à septembre 2017. L'étude tentera de déterminer, à travers l'analyse des prélèvements opérés sur des sujets féminins et masculins, les variations de la fréquence d'isolement, des taux de résistances et des phénotypes de résistances des souches d'*Escherichia coli*.

Les résultats des analyses feront l'objet de commentaires et de discussions avant de conclure et de faire des recommandations. L'étude présuppose que les conduites de laboratoire sont optimales et que par conséquent, les résultats des analyses sont dignes de foi.

Objectifs

1.1 Objectif général

Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli* isolées en routine au Laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017.

1.2 Objectifs spécifiques

- ✚ Déterminer la fréquence d'isolement des souches d'*E. coli* parmi les entérobactéries isolées au LRM du Centre d'Infectiologie Charles Mérieux ;
- ✚ Déterminer les taux de résistance des souches d'*E. coli* aux antibiotiques testés ;
- ✚ Déterminer les phénotypes de résistance.

Chapitre 1 : Généralités

1.1 Famille des Enterobacteriaceae

1.1.1 Définition et classification

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

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

La famille des Enterobacteriaceae regroupe différents genres :

Certains genres sont anciennement décrits et le plus souvent rencontrés en pathologie. Ce sont :

- *Escherichia, Shigella.*
- *Salmonella, Arizona, Citrobacter.*
- *Proteus, Providencia, Morganella.*
- *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia*
- *Yersinia, Edwardsiella.*

D'autres genres, plus récemment décrits, sont parfois trouvés dans l'environnement et sont rarement isolés chez l'homme. Ce sont : *Buttiauxella, Cedecea, Ewingella, Kluyvera, Koserella, Leclercia, Leminorella, Moellerella, Obesumbacterium, Rahnella, Tatumella, Trabulsiella, Xenorhabdus, Yokenella* (11).

Tableau I : Entérobactéries colonisant habituellement l'homme et responsables d'infections (12).

| Principaux genres | | |
|---|---|--|
| <i>Citrobacter freundii</i> | <i>Hafnia alvei</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| <i>Citrobacter (diversus) koseri</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Serratia liquefaciens</i> |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Shigella dysenteriae</i> (groupe A) |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | <i>Klebsiella ozaenae</i> | <i>Shigella flexneri</i> (groupe B) |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i> | <i>Shigella boydii</i> (groupe C) |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Shigella sonnei</i> (groupe D) |
| Groupe <i>Enterobacter agglomerans</i> | <i>Proteus vulgaris</i> | <i>Yersinia pestis</i> |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> | <i>Proteus penneri</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> |
| <i>Enterobacter sakazakii</i> | <i>Providencia rettgeri</i> | subsp. <i>Enterocolitica</i> |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | <i>Providencia rettgeri</i> | <i>Yersinia intermedia</i> |
| <i>Enterobacter (cancerogenous) taylora</i> | <i>Providencia stuartii</i> | <i>Yersinia pseudo tuberculosis</i> |

1.1.2 Habitat

Le nom d'Entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. La présence des entérobactéries dans le milieu extérieur résulte pour certaines espèces bactériennes de souillures fécales (importance en hygiène alimentaire) et pour d'autres de la pollution d'origine saprophyte.

On les rencontre donc abondamment dans le tube digestif, dans les cadavres d'animaux, les fumiers et les eaux d'égout. Elles peuvent aussi être trouvées dans le sol et beaucoup moins abondamment dans les poussières ou dans l'air, et par contamination, dans les eaux d'alimentation. On peut aussi en retrouver à la surface des téguments et des muqueuses (13).

1.1.3 Caractères cultureux

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

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

Les colonies sont lisses, bombées, brillantes et humides, elles ont 2 à 4mm de diamètre. Le bouillon est trouble de façon homogène

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

Les colonies sont rugueuses, sèches, à contours irréguliers et de teinte mate. En bouillon, les formes R donnent un aspect grumeleux.

- Les colonies muqueuses sont habituelles avec les *Klebsiella*. Leur diamètre peut dépasser 10mm ; elles ont une tendance à la confluence. On peut les rencontrer aussi avec d'autres espèces notamment *Salmonella Paratyphi B*.
- Les colonies naines s'observent avec des souches déficientes dans certaines de leurs chaînes métaboliques. Elles ne sont pas exceptionnelles chez les *Escherichia coli* isolés d'infections urinaires (10).

1.1.4 Caractères antigéniques

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

1.1.4.1 Les antigènes O

Ce sont des antigènes de paroi constitués de lipopolysaccharides (LPS) qui sont thermostables et résistent à l'alcool ou à l'acide. Les réactions d'agglutination se produisent lentement, sont constituées d'agglutinats granulaires, difficilement dissociables par agitation.

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

1.1.4.2 Les antigènes H

Ce sont des antigènes flagellaires qui ne sont donc présents que chez les souches mobiles. Constitués d'une protéine, la flagelline, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Les réactions d'agglutinations se produisent rapidement, sont constituées d'agglutinats floconneux, facilement dissociables par agitation.

1.1.4.3 Les antigènes K

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

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

1.1.4.4 Les antigènes kunin

Cet antigène commun aux Enterobacteriaceae n'est pratiquement retrouvé que dans cette famille et a un intérêt taxonomique (10).

1.1.5 Pouvoir pathogène naturel

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

- ✓ **les bactéries pathogènes spécifiques (BPS)** que l'on ne retrouve pas à l'état commensal (en dehors des porteurs sains) et dont la présence dans les milieux extérieurs n'est qu'un phénomène transitoire. Les maladies qu'elles engendrent sont dues à un défaut d'hygiène et la contamination se produit soit par contact direct, soit par l'intermédiaire d'un vecteur (alimentaire ou animal). Citons les *Salmonella*, les *Shigella*, et les *Yersinia*.
- ✓ **les bactéries pathogènes opportunistes (BPO)**
Ces BPO peuvent provenir de la flore digestive commensale normalement résidente.

Les infections qu'elles peuvent engendrer ont pour origine :

- soit un point de départ endogène, ce qui s'explique par leur commensalité,
- soit un point de départ exogène. Il convient alors de distinguer deux aspects :
 - ✓ l'un est rencontré dans l'hospitalisme infectieux où un défaut d'asepsie permettra la transmission à partir d'un milieu contaminé ou d'un malade, par instrumentation ou par voie manu portée ;
 - ✓ l'autre s'explique par le fait que ces bactéries de la flore digestive peuvent se retrouver, par élimination, dans la nature à l'état transitoire. Si elles n'engendrent généralement pas d'infections elles sont cependant le signe d'une contamination fécale, voire d'un défaut d'hygiène. Ce problème est d'une importance toute particulière puisque c'est principalement de la recherche d'espèces commensales telles que *Escherichia coli*, entérocoques et *Clostridium perfringens* et c'est de leur absence que dépend la qualité sanitaire d'une eau ou d'un produit alimentaire (13).

Les entérobactéries peuvent représenter 80% des isolats cliniquement significatifs des bacilles gram négatifs et 50% des bactéries cliniquement significatives dans les laboratoires de microbiologie clinique. Ils représentent près de 50% des cas de septicémie, plus de 70% des infections urinaires et un pourcentage significatif d'infections intestinales (14).

1.1.6 Résistance des entérobactéries aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques. Elle peut toucher toutes les familles d'antibiotiques habituellement actives sur les entérobactéries. La résistance des entérobactéries aux antibiotiques est variable en fonction de l'espèce

(résistance naturelle) et de la souche (résistance acquise). Elle résulte de quatre mécanismes : imperméabilité, efflux, modification de la cible de l'antibiotique (PLP), production d'enzyme (15).

1.1.6.1 Résistance aux Bêta-lactamines

1.1.6.1.1 Résistance naturelle et phénotypes « sauvages »

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

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

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

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

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

- ✓ **Groupe 2** : phénotype « pénicillinase de bas niveau »

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

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

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

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

✓ **Groupe 3** : phénotype «céphalosporinase de bas niveau »

Les entérobactéries appartenant à ce groupe réunissent des espèces productrices de céphalosporinases de classe C (AmpC, groupe fonctionnel 1) chromosomiques et inductibles par les Bêta-lactamines (molécules fortement inductrices : céfoxitine, imipénème, clavulanate). Ces céphalosporinases sont très répandues chez les entérobactéries isolées en bactériologie clinique : *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* (et les autres espèces de ce genre), *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri* et *Pantoea agglomerans*.

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

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

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

✓ **Groupe 4** : *Yersinia enterocolitica* et *Serratia fonticola*

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

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

✓ **Groupe 5** : phénotype « céfuroximase »

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

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

Les entérobactéries *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Kluyvera georgiana*, *Rahnella aquatilis*, *Citrobacter sedlakii* et *Erwinia persicina* produisent naturellement des bêta-lactamases à spectre étendu de classe A (groupe 2be). Ces BLSE souvent exprimées à bas niveau confèrent une diminution de sensibilité ou une résistance aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines, aux C1G et aux C2G, à l'exception des céphamycines. La résistance aux uréïdopénicillines et aux C3G est souvent inapparente. Aucune règle de lecture interprétative n'a été proposée à ce jour pour ces espèces. L'activité des enzymes produites suggère une interprétation des résultats « sensibles » en « intermédiaire » pour les pénicillines, de même que pour les C3G si le test de synergie est positif (15).

1.1.6.1.2 Résistance acquise et phénotypes de résistances

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

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

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

- une activité pénicillinase faible responsable d'une résistance limitée aux aminopénicillines (le diamètre d'inhibition est généralement absent contrairement à ce qui est observé dans la résistance naturelle des espèces du groupe 2) et aux carboxypénicillines. La sensibilité aux uréïdopénicillines et C1G apparaît peu ou pas affectée.
- une activité pénicillinase forte responsable d'une résistance aux aminopénicillines, à leur association aux inhibiteurs, aux carboxypénicillines, aux uréïdopénicillines et aux C1G. Une diminution de la sensibilité est communément observée pour les associations ticarcilline-clavulanate et pipéracilline-tazobactam. La résistance peut s'étendre aux C2G, principalement chez *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp. et *C. freundii*.

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

✓ **Phénotype « pénicillinase résistante aux inhibiteurs »**

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

✓ **Phénotype « beta-lactamase à spectre étendu »**

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

✓ **Phénotype « hyper OXY »**

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

✓ **Phénotype « céphalosporinase de haut niveau »**

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

Tableau II : Attitude des entérobactéries vis-à-vis des bêta-lactamines (16).

| Antibiotiques | P sauvage | PBN | PHN | CASE | TRI | BLSE |
|---------------------|-----------|-----|-----|------|-----|------|
| Amino | S | R | R | R | R | R |
| Amino+IBL | S | S | I/R | R | R | R |
| Carboxy | S | R | R | S | R | R |
| C1G | S | I | I/R | R | S | R |
| Fox | S | S | S | R | S | S |
| C3G | S | S | S | S | S | R |
| Carbapénèmes | S | S | S | S | S | S |

Amino : Aminopénicilline : Amoxilline

Amino+IBL : Amoxilline-acide clavulanique

Carboxy : Carboxypénicilline : Ticarcilline

C1G : Cefalotine

C2G : Cefotaxime

C3G : Ceftazidime

Carbapénème : Imipénème

S : Sensible

R : Résistant

I : Intermédiaire

1.1.6.2 Résistance aux aminosides

Les différents genres composant la famille des entérobactéries sont naturellement sensibles aux aminosides à l'exception de *Providencia* et un grand nombre de *Serratia marcescens*. L'inactivation enzymatique des aminosides est le mécanisme de la résistance acquise le plus fréquent. Les enzymes sont codés par des gènes plasmidiques qui peuvent atteindre tout ou partie des aminosides.

Le second mécanisme de la résistance acquise aux aminosides par imperméabilité cellulaire est moins souvent observé chez les entérobactéries. L'imperméabilité cellulaire entraîne le plus souvent une résistance croisée aux différents aminosides. Le troisième aspect de la résistance acquise est l'altération de cible ribosomale par mutation chromosomique qui est encore plus rare chez les entérobactéries (15).

1.1.6.3 Résistance aux quinolones

Les entérobactéries sont sensibles aux quinolones classiques (acide nalidixique, acide pipemidique, etc.) et aux fluoroquinolones (péfloxacin, ofloxacin, etc.). Néanmoins, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont plus ou moins bonnes selon l'espèce d'entérobactéries et les différentes quinolones.

La résistance acquise aux quinolones, dont le support génétique est exclusivement chromosomique (mutations), est due à deux mécanismes qui peuvent être associés : altération de la cible et/ou diminution de la perméabilité. Il est important de constater que, dans la plupart des cas, la résistance à l'acide nalidixique s'accompagne d'une résistance aux autres quinolones.

1.1.6.4 Phénotype de résistance des entérobactéries aux quinolones

La résistance des entérobactéries aux quinolones est due principalement à des modifications de l'ADN gyrase. Cette résistance est croisée entre toutes les quinolones. Les marqueurs suivant sont testés : l'acide nalidixique, la norfloxacine et la ciprofloxacine.

Tableau III : Phénotype de résistance aux quinolones (16).

| Phénotype | Acide nalidixique | Norfloxacine ou Péfloxacin | Ofloxacine ou Ciprofloxacine |
|---------------|-------------------|----------------------------|------------------------------|
| I « Sauvage » | S | S | S |
| II | R | S | S |
| III | R | I/R | S |
| IV | R | R | R |

A. nalidixique : réponse valable pour l'ensemble des Q G 1

Si Norfloxacine sensible, réponse valable pour l'ensemble des FQ (Sensible).

1.1.6.5 Resistance aux autres antibiotiques et antibactériens actifs sur les bacilles à gram négatifs

Les entérobactéries habituellement résistantes aux macrolides, lincosamides et synergistines sont habituellement sensibles aux phénicoles, tétracyclines, sulfamides, triméthoprime, nitrofuranes, fosfomycine et polymyxine (colistine). Mais la plupart des espèces de *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* et *Serratia* sont résistantes aux tétracyclines, nitrofuranes et polymyxine. Enfin la rifampicine n'est active que sur certaines espèces d'entérobactéries. En plus de la résistance naturelle, les entérobactéries peuvent devenir résistantes (résistance acquise) à un ou plusieurs de ces antibiotiques ou antibactériens par mutations chromosomiques ou acquisition de plasmides de résistance (13).

Enfin un critère particulier de gravité est représenté par le fait que ces souches d'entérobactéries présentent souvent des résistances multiples aux antibiotiques. Un nombre croissant de souches, en particulier dans le genre *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* et *Providencia*, quelques souches de *Proteus* indole-positif et des souches d'*Escherichia coli* céfalotine résistance, possèdent des bêta-lactamases qui augmentent le phénomène de résistance à de nombreux antibiotiques du groupe des bêta-lactamases. L'émergence et l'augmentation potentielle de souches d'entérobactéries productrices de BLSE (bêta-lactamases à spectre élargi) en particulier chez *K. pneumoniae* constituent un phénomène inquiétant. La détection de ces souches n'est pas seulement importante pour le patient mais également dans le cadre de la surveillance des infections nosocomiales (17).

1.1.7 Conservation des souches

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

- envoi de souches pour études plus approfondies (sérotypage, lysotypage, étude de virulence...) par un laboratoire de référence ;
- études ultérieures de similitudes pour des souches isolées chez un même malade ou chez des malades différents (enquêtes épidémiologiques, mises en évidence d'infections nosocomiales...)

- souches de référence utiles pour l'identification de souches inconnues, les études taxonomiques, l'enseignement ou la validation de techniques (antibiogramme, dosage de vitamines...). Ces souches proviennent généralement de centres spécialisés (collections) ;
- souches à usage industriel : production de vaccins, d'antibiotiques, d'enzymes, de dérivés laitiers et agro-alimentaire (fermentations) ;
- Souches mutantes ayant des propriétés particulières.

1.1.7.1 Principes généraux

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

Il convient dans tous les cas d'éviter :

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

La conservation de bactéries nécessite de les placer en état de vie ralentie ou momentanément suspendue (spores), donc dans des conditions peu favorables à leur multiplication. Les états secs ou congelés seront privilégiés et dans le cas de repiquages sur milieux de cultures, ceux-ci seront pauvres, exempts de sucres fermentescibles, à l'abri de l'action de l'oxygène de l'air (tube hermétique ou culture recouverte d'huile minérale). D'une façon générale, la culture bactérienne sera en tout début de phase stationnaire afin de privilégier la conservation de cellules bactériennes matures, plus résistantes aux agressions liées aux diverses méthodes de conservation.

1.1.7.2 Moyens de conservation

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

Au laboratoire, c'est dans ce délai qu'une conservation sur milieux de culture est envisageable sans être trop fastidieuse. L'intervalle entre deux repiquages sera fonction de la bactérie (variable selon le genre, l'espèce, voire au sein d'une même espèce), du milieu employé et des conditions ambiantes.

Quelques règles générales : le milieu de culture choisi est incubé (18 à 24 heures à la température optimale de la souche), puis conservé à la température du laboratoire ou du réfrigérateur à 4°C. Les cultures seront conservées à l'obscurité, tubes hermétiquement bouchés, pour éviter la dessiccation et limiter l'action de l'oxygène de l'air. Dans ce dernier but, la culture incubée peut être recouverte d'huile minérale stérile ou scellée sous vide (bactéries anaérobies). Pour des bactéries peu fragiles (entérobactéries, staphylocoques, corynébactéries, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*...), il n'y a pas de problèmes particuliers de conservation pendant quelques semaines à 22°C.

Pour expédition, il existe dans le commerce des milieux de transports très utiles pour l'expédition de souches bactériennes y compris des bactéries très délicates mais dont il convient de s'assurer de la capacité à maintenir en survie la bactérie considérée. Pour des bactéries de culture difficile et nécessitant une

atmosphère particulière (anaérobiose ou microaérophilie), on préférera l'expédition de la culture bactérienne dans des géloses profondes ou dans des sachets préservant cette atmosphère.

1.1.7.2.2 Conservation de moyenne durée (quelques mois)

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

1.1.7.2.3 Conservation de longue durée (plusieurs années)

Pour cette durée de conservation un maximum de garanties quant à la viabilité des échantillons sera recherché. Pour certaines bactéries, une simple dessiccation pourra suffire à maintenir un état de survie très long, mais pour la plus grande majorité des autres des méthodes plus sophistiquées comme la lyophilisation ou la congélation en azote liquide seront mises en œuvre (18).

1.2 Escherichia coli

1.2.1 Aperçu Historique

Theodor Escherich, en observant la fréquence des diarrhées néonatales, avait déjà posé la question de l'implication du colibacille dans les entérites. Après la seconde guerre mondiale, les connaissances ont convergé pour établir le concept de virulence de certaines souches de *E. coli*. Dans les années 1950, de nombreuses souches d'*E. coli* ont été incriminées en tant qu'agent étiologique de diarrhées infantiles.

On sait maintenant que certaines souches « spécialisées » d'*E. coli* sont associées à des pathologies très diverses (y compris extra-intestinales), tant chez l'Homme que chez l'animal ; diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires, méningites, septicémies, « maladie des hamburgers », le syndrome hémolytique et urémique, etc. Mis à part cela, la plupart des souches d'*Escherichia coli* sont bénéfiques et même essentielles entrant dans la production des hydrocarbures et faisant objet d'études en xénobiologie (19).

1.2.2 Définition et classification

Escherichia coli est l'espèce type du genre *Escherichia* qui appartient lui-même à la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études, est responsable aux cotés de *Klebsiella pneumoniae* et de *Proteus mirabilis* de plus de 80% des infections humaines dues à des entérobactéries (20).

Le genre *Escherichia* comprend 4 autres espèces isolées chez l'homme : *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia fergusonii*, et la dernière en date, *Escherichia albertii*, parfois appelées *Afnia alvei*-like. Leur prévalence est très faible. Les espèces les plus proches de *E. coli* sur le plan génotypique sont *E. fergusonii* et *E. albertii*, l'hybridation ADN-ADN indiquant 55 à 64% d'homologie.

Viennent ensuite les espèces *E. vulneris* et *E. hermannii* avec 39 à 46% d'homologie (21). *E. blattae* est un commensal des cafards et ne fait pas partie des espèces humaines (22). En revanche, *E. adecarboxylatata* est reclassée dans le genre *Leclercia* et devient *Leclercia adecarboxylatata* (20).

1.2.3 Caractères Bactériologiques

1.2.3.1 Souches typiques de *E. coli*

E. coli possède les caractères classiques des *Enterobacteriaceae*. C'est un bacille à gram négatif, non sporulé, assez grand (1-5×2-6 µm). Notons que *E. coli* fermente le lactose (95% des souches), produit de l'indole à partir du tryptophane, n'utilise pas le citrate (Simmons) comme source d'énergie et de carbone, présente une réaction de Vogues Proskauer (VP) négative.

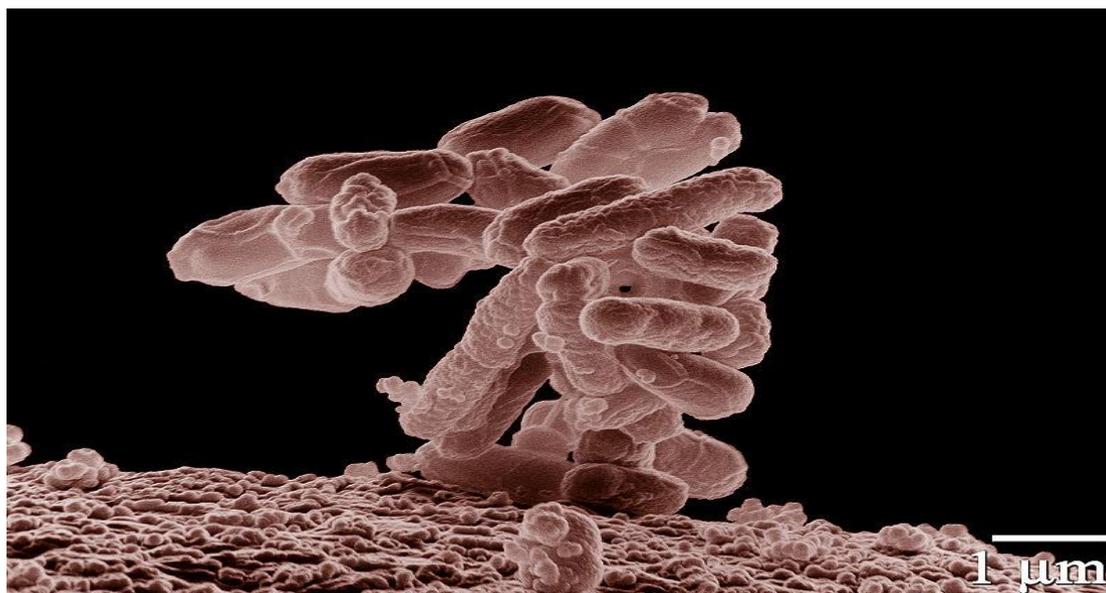
Avec les décarboxylases, il possède une lysine décarboxylase (LDC) positif chez plus de 90% des souches, et parfois une ornithine décarboxylase (ODC) positif chez environ 50% des souches). Par contre, il ne possède pas d'arginine dihydrolase (ADH).

La plupart des souches se multiplient rapidement, sur les milieux gélosés ordinaires ou sélectifs, elles donnent en 18 à 24 heures des colonies d'environ 2mm de diamètre qui ont un aspect caractéristique mais non spécifique (rondes, plates en « dos de scarabée » et à bord régulier) (21).

1.2.3.2 Souches atypiques de *E. coli*

Il n'est pas exceptionnel d'isoler des souches de *E. coli* ne présentant pas tous les caractères habituels mentionnés ci-dessus. Ces souches atypiques peuvent revêtir quatre aspects principaux.

- *E. coli* formant des colonies naines (2 à 3% des souches)
Les bactéries constituant ces colonies sont aussi appelées « *E. coli* déficients ou *E. coli* thymineless ». La formation de colonies naines résulte de déficiences métaboliques dues à des mutations (déficiences en thymidine, en thiamine, en cystéine, en glutamine, en pantothénate...). Ces bactéries ne se multiplient pas sur le milieu de Mueller-Hinton (qui n'est pas riche en thymidine) et le font très mal sur gélose Trypto-caseine Soja. Des colonies presque normales peuvent être obtenues sur gélose au sang, milieu de Mueller-Hinton enrichi avec 5% de sang ou sur des milieux sélectifs lactosés additionnés de thiosulfate de sodium.
- *E. coli* ayant perdu des caractères
Il n'est pas rare d'isoler des souches de *E. coli* ne présentant pas certains caractères considérés comme fondamentaux : souches ne produisant pas d'indole, ne fermentant pas le lactose, immobiles... Il existe également des souches à la fois immobiles, agazogènes, ne pouvant fermenter le lactose en 24 heures, présentant en majorités un test à l'ONPG négatif, et ayant souvent une activité lysine décarboxylase faible ou négative. Parmi ces souches, certaines constituent actuellement une sous-espèce de *E. coli* : coli subsp. Elles ne doivent pas être confondues avec une bactérie du genre *Shigella*.
- Variétés muqueuses de *E. coli*, les colonies ont un aspect muqueux ; elles sont bombées, ont tendance à confluer et ont généralement un diamètre supérieur à 2mm. Les bactéries constituant ces colonies sont immobiles et entourées d'une importante capsule de nature polysidique.
- *E. coli* ayant acquis des caractères métaboliques, il s'agit de souches hébergeant un (ou plusieurs) plasmide(s) dont les gènes peuvent coder des propriétés métaboliques additionnelles. Les expressions phénotypiques les plus courantes sont « H₂S-positif » associé ou non à d'autres caractères (fermentation du raffinose, résistance à des antibiotiques tels que les tétracyclines...) ou le caractère « Urease- positif » (dans ce cas les souches peuvent être confondues avec des souches de *Yersinia enterocolitica* produisant de l'indole) (21).



Source : Wikipédia 23/01/18

Figure 1 : Colonies d'*Escherichia coli*, grossissement 10000 (19).

1.2.4 Propriétés antigéniques

Les composants antigéniques de *E. coli* sont variés.

- Les antigènes somatiques O qui correspondent au lipopolysaccharide de surface ont la spécificité des polysaccharides. Au moins 164 spécificités antigènes O sont connues. L'identification de l'antigène O (sérotype O) est habituelle pour décrire une souche de colibacille. Elle est compliquée et réalisée par des laboratoires spécialisés, en particulier le "Statens Serums Institut". Cependant des antiserums agglutinants correspondant aux sérogroupes O les plus fréquents des souches isolées de coproculture, voire d'hémoculture ou d'uroculture sont commercialisés et peuvent être utilisés sans difficultés.
- Les antigènes H qui correspondent aux protéines flagellaires et dont plus de 50 ont été identifiés en utilisant des méthodes d'agglutination en milieu liquide ou d'immobilisation en gélose mobilités. La recherche de ces antigènes est souvent délicate en raison de leur fragilité et de la faible mobilité de la plupart des souches lors de leur isolement. Leur identification permet de définir le sérotype d'une souche de colibacille. En effet, le sérotype rassemble les spécificités des antigènes O, H et si possible K. Sa détermination (sérotypie) permet de caractériser une souche, en particulier les souches pathogènes et épidémiques : C'est le cas par exemple du sérotype O111 :B4 : H 2 de souches entéropathogènes ou O157 : H7 de souches entérohémorragiques.
- Les antigènes de surface de nature polysaccharidique ou protéique dont la présence est variable selon les souches et dont la structure est hétérogène.
- Les antigènes polysaccharidiques, appelés antigènes K, constituent une enveloppe d'importance variable et chez certaines souches une véritable capsule. Dans ce dernier cas, il s'agit des antigènes K de types A de Kaufman : Les colonies bactériennes sont alors mucoïdes et l'antigène O est complètement masqué (il ne peut être révélé qu'après chauffage). Pour la majorité des souches

cependant l'antigène K est de types B ; il s'agit d'une simple enveloppe qui comporte au moins 80 spécificités. L'identification des antigènes K est généralement réalisée par des techniques de précipitations en gélose.

- Les antigènes protéiques, appelés antigènes F, sont présents chez les souches ayant des propriétés d'adhérences. Ils correspondent à des systèmes d'adhésion de plusieurs types.

Les antigènes F1 sont associés aux pili communs (pili de type I ou *fimbriae* de type I). Ils ont des résidus mannose pour récepteurs et adhèrent donc aux structures portant ces résidus comme le mucus ou les hématies. Les couches qui les produisent sont hémagglutinantes ; cette propriété est inhibée quand du mannose est ajouté aux hématies (hémagglutination sensible au mannose ou MSHA). Les pili I d'information génétique chromosomique régulée en fonction de l'environnement de la bactérie (leur synthèse nécessite au laboratoire la culture des bactéries en bouillon et en aérobiose). Ils sont répartis sur toute la surface de la cellule bactérienne et sont rectilignes.

Les antigènes F2, F3... correspondent à des propriétés d'adhérences beaucoup plus spécifiques que celles liées aux antigènes F1. En effet, les bactéries qui les produisent n'adhèrent qu'à un type cellulaire précis (cellules uro-épithéliales ou cellules intestinales par exemple) et aux hématies de certaines espèces animales. Les propriétés d'adhérences spécifiques dues à ces antigènes constituent un facteur essentiel du pouvoir pathogène de *E. coli* et sont caractéristiques des variétés pathogènes. Ainsi les *E. coli* "uropathogènes" sont capables d'adhérer aux cellules uro-épithéliales grâce aux antigènes F7 à F13 (appelés aussi *fimbriae* ou adhésines de types P). D'autres part, les *E. coli* "entérovirulents" sont capables d'adhérer aux cellules intestinales grâce à d'autres antigènes. Il s'agit par exemple, en ce qui concerne les souches entérotoxigènes (ETEC), des antigènes F2 ou CFA/1 (Colonization Factor Antigen 1) à F5. L'adhésion et l'hémagglutination conférés par ces antigènes sont résistantes au mannose (MRHA). Les antigènes sont d'information soit chromosomique, soit plasmidique. Leur structure est généralement filamenteuse mais parfois non filamenteuse (la protéine est alors organisée en une fine enveloppe située à la surface de la bactérie), leur production est fortement régulé.

Tableau IV : Caractères biochimiques différentiels des principales espèces du genre *Escherichia coli* (20)

| Caractères | <i>E. coli</i> | | <i>E. hermannii</i> | <i>E. vulneris</i> | <i>E. fergusonii</i> |
|-------------------------|----------------|----------|---------------------|--------------------|----------------------|
| | Mobile | Immobile | | | |
| Pigment jaune | - | - | + | D | - |
| Mobilité à 36°C | + | - | + | + | + |
| Gaz en glucose | + | - | + | + | + |
| Production d'indole | + | D | + | - | + |
| Lysine décarboxylase | + | D | - | D | + |
| Ornithine décarboxylase | D | - | + | - | + |
| B-xylosidase | D | D | D | + | - |
| B-glucoronidase | + | D | - | - | - |
| Croissance en KCN | - | - | + | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | + |
| Arabitol | D | D | D | - | + |
| D- Sorbitol | + | D | - | - | - |
| Mélibiose | D | D | - | + | - |
| Cellabiose | - | - | + | + | + |

1.2.5 Habitat, pouvoirs pathogène naturels et facteurs de pathogénicité

Escherichia coli est un hôte normal du tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. L'appellation commune "colibacille" est une contraction de « bacille du colon » rappelant son caractère de bactérie commensale du tube digestif. Chez l'homme il représente l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie (10^6 à 10^8 bactéries par gramme de selles chez l'adulte). A ce titre *E. coli* constitue un bon indicateur d'une contamination fécale, sa présence dans l'eau, les aliments ou le sol étant anormal.

Certaines souches, possédant des facteurs de pathogénicité, peuvent être responsables d'infections intestinales et d'infections extra-intestinales : infections de l'arbre urinaire, suppurations diverses, méningites et bactériennes (tableau I)

La présence de facteurs de virulences spécifiques (facteurs de colonisation, toxines...) permet de regrouper les souches dans les pathovars (variétés pathogéniques). Chaque pathovar est associé à un syndrome infectieux caractéristique. L'identification d'une souche à espèce *E. coli* par les techniques classiques n'est pas suffisante pour apprécier la responsabilité de celle-ci dans l'infection, donc de caractériser le pathovar auquel la souche appartient, donc de caractériser ses facteurs de virulence.

1.2.6 Pathovars d'*E. coli*

Il existe au moins cinq catégories de *E. coli* diarrhégoïques reconnues :

E. coli (STEC) produisant une toxine shiga (également appelée EHEC), *E. coli* entérohémorragiques, *E. coli* entérotoxigénique (ETEC), *E. coli* enteropathogène (EPEC), *E. coli* entéroagrégatif (EAEC) et *E. coli*

enteroinvasive (EIEC). La signification clinique de plusieurs autres groupes de *E. coli* diarrhéenagique putatif, en particulier *E. coli* diffusément adhérent (DAEC), n'est pas claire.

1.2.6.1 *E. coli* Enteropathogène (ECEP, « Enteropathogenic *E. coli* » ou EPEC)

Les EPEC (ECEP), responsables dans le passé d'infections intestinales infantiles graves de répartition mondiale (ils ont été appelés *E. coli* de gastroentérite infantile-GEI), restent encore une cause importante de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement. Des études réalisées au Brésil, au Mexique, en Afrique du Sud ou au Bangladesh ont montré que 30 à 40% des diarrhées infantiles sont dues aux EPEC. Ceux-ci seraient responsables de plusieurs centaines de milliers de décès chez les enfants chaque année. Dans les pays industrialisés, ils étaient encore associés jusqu'en 1970, à de nombreux épisodes épidémiques en particulier dans les services de pédiatrie. Cette situation a pratiquement disparu grâce aux projets réalisés en matières d'hygiène microbienne dans les collectivités à risque (services de pédiatrie, crèches).

L'infection par les EPEC est caractérisée par l'émission de selles aqueuses avec du mucus, mais ne contenant ni leucocytes ni hématies. Elle s'accompagne fréquemment de fièvre, malaise et vomissement surtout chez l'enfant dans la tranche d'âge de 18 mois. Lors des épidémies, la souche responsable était déterminée par son stéréotype (O111 :B4, O26 :B6...). Ainsi 12 stéréotypes prévalents avaient été caractérisés et étaient représentés de la majorité des souches. Cependant, actuellement il faut considérer qu'une souche appartenant à l'un de ces sérotypes n'est pas obligatoirement pathogène, il est nécessaire pour déterminer qu'il s'agit d'un EPEC de mettre en évidence ses facteurs de pathogénités.

Le pouvoir pathogène des EPEC se manifeste par l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales de l'intestin grêle et l'induction de lésions histopathologiques au niveau de la bordure en brosse des entérocytes. L'adhésion de types localisé (phénotype LA) est caractéristique des EPEC. Les bactéries forment des micro-colonies à la surface des cellules en culture. Elles sont reliées entre elle et à la cellule infectée par des *fimbriae* appelés BFP (« Bundle Formin Pili ») dont les gènes sont localisés sur le plasmide EAF (pour EPEC Adherence Factor). Le rôle primordial des BFP dans l'étape initial d'adhésion est actuellement controversé.

Les lésions d'attachement-effacement (A/E) sont caractérisées par un effacement de micro-villosités de la bordure en brosse des entérocytes et par une adhésion intime des bactéries à la cellule hôte. Une condensation d'actine cellulaire sous-jacente aux sites d'adhésion permet la formation d'un piédestal.

Ces lésions histo-pathologiques s'observent in vivo au niveau de l'intestin grêle d'enfants développant une diarrhée à EPEC ou d'animaux infectés. La condensation d'actine peut être visualisée in vitro sur cellules épithéliales en culture par le FAS-TEST (Fluorescence Actin Staining).

L'ensemble des gènes nécessaires à l'expression du phénomène d'« attachement-effacement » est regroupé au niveau d'un même locus chromosomique de 35 kb, appelé LEE pour « Locus of Entérocyte Effacement ». Le LEE comprend des gènes codant des propriétés impliquées dans la sécrétion, divers effecteurs et des régulateurs transcriptionnels. Les gènes codant le système de sécrétion de type III (TTSS pour Type Three Secretion System) sont proches des autres TTSS décrits chez de nombreuses espèces pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* ou *Listeria*.

Le gène esp (« EPEC secreted proteins ») code des protéines également impliquées dans la translocation des effecteurs bactériens dans la cellule hôte. L'ensemble TTSS/ Esp forme une structure semblable à une seringue moléculaire capable d'injecter des protéines effectrices dans la cellule eucaryote. Il présente une structure filamenteuse principalement composée de la protéine EspA ; ces filaments semblent être produits très précocement dans l'infection et pourraient intervenir dans l'étape initiale d'adhésion. Les protéines EspB et EspD forment un pore dans la membrane de la cellule cible ; mais auraient également un rôle d'effecteur (sur la polymérisation d'actine par exemple).

Le gène eae (« *E.coli* attaching and effacing ») code l'intimine impliquée dans l'adhésion intime des bactéries à la cellule hôte. Celle-ci reconnaît le récepteur Tir (Translocate Intimin Receptor) synthétisé par la bactérie, injecté par le TTSS et inséré dans la membrane de l'entérocyte. Une phosphorylation de Tir par les Kinases de la cellule eucaryote est indispensable à la polymérisation d'actine et la formation du piédestal. L'expression des gènes du LEE est régulée par de nombreux facteurs, notamment des facteurs environnementaux par l'intermédiaire du « quorum-sensing » et d'un activateur de transcription appelé LER pour « LEE-Encoded Regulator ».

Les EPEC induisent le déclenchement d'une réponse inflammatoire *in vivo* au niveau de la muqueuse colique caractérisée par une synthèse accrue d'IL-8 due à l'activation de la voie NF-κB et des MAPKinases (« Mitogen-Activated Protein Kinases ») (21).

1.2.6.2 *E. coli* entérotoxigène (ECET, « Enterotoxinogenic *E. coli* » ou ETEC)

Les ETEC (ECET) sont fréquemment responsables de la « diarrhée du voyageur » (« Tourista ») et constituent la principale cause de la diarrhée infantile dans les pays en voie de développement, ou la plupart des enfants présentent 2 à 3 infections à ETEC par an. Ils sont à l'inverse rarement incriminés dans les pays industrialisés. L'infection se produit après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés et se manifeste par un syndrome cholériforme associant une diarrhée dans les élevages de bovins, ovins, et porcins, affectant principalement les animaux nouveau-nés.

Le pouvoir pathogène des ETEC est dû à leur capacité à coloniser les entérocytes de l'intestin grêle et à sécréter des toxines cytotoxiques (entérotoxines) entraînant une fuite d'eau et d'électrolytes.

Les ETEC adhèrent aux cellules épithéliales intestinales par l'intermédiaire des facteurs d'adhésion de nature protéique et ont une structure filamenteuse ou fibrillaire. Les antigènes K88 et K99 ont été les premiers facteurs décrits dans les souches ETEC responsables d'épidémies de diarrhée respectivement chez les porcelets, les veaux et les agneaux. Pour les souches ETEC isolées chez l'homme, plus de 20 facteurs ont été décrits mais seuls quelques-uns ont été réellement incriminés dans la pathogenèse de la diarrhée.

Le premier facteur d'adhésion décrit a été dénommé CFA/1 pour « Colonization Factor Antigen 1 ». Dans la nouvelle nomenclature, seul ce facteur d'adhésion a conservé son nom d'origine, les autres sont dénommés CS pour « Coli Surface ». Ils confèrent aux ETEC des propriétés hémagglutinantes, et un pouvoir d'adhésion spécifique à la bordure en brosse des entérocytes sans induction de modifications cellulaires.

Deux entérotoxines peuvent être produites par les souches ETEC, la toxine thermolabile (entérotoxine LT) et la toxine thermostable ST. La LT est une toxine de type AB composée de 5 sous-unités B pour « binding » et d'une sous unité A pour « activité ». Sa structure et ses propriétés sont très voisines de celles de la toxine cholérique. La toxine ST ne comprend que 19 acides aminés. Ces deux toxines ont une action cytotonique due à l'augmentation de la production des deux principaux seconds messagers intracellulaires (AMPc et GMPc) qui contrôlent la sécrétion ionique. Ces facteurs de pathogénicité, à savoir adhésion de la muqueuse de l'intestin grêle et synthèse de toxine, sont codés par des gènes à localisation plasmidique (21).

1.2.6.3 E. coli entéroinvasif (ECEI « Enteroinvasive E. coli » ou EIEC)

Les EIEC (ECEI) peuvent être responsables de diarrhées aqueuses, mais aussi du syndrome dysentérique caractérisé par de la fièvre et une diarrhée sanglante et purulente, analogue à celui provoqué par les Shiguelles. Sur le plan taxonomique, biochimique, génétique et du pouvoir pathogène, les EIEC sont très proches de *Shigella*. L'incidence des infections dues à des EIEC paraît faible, peut-être en raison des difficultés rencontrées pour les identifier et de la confusion possible avec les *Shigella*. Lorsque les EIEC ont été recherchés systématiquement lors d'enquêtes sur l'étiologie des diarrhées, leur fréquence n'était pas négligeable. C'est le cas par exemple en Asie (5% en Thaïlande, 16% à Calcutta) et en Amérique du Sud (21% des diarrhées infantiles au Brésil).

Le pouvoir pathogène des EIEC est très voisin de celui de *Shigella*. Par similitude avec le modèle *Shigella*, les EIEC auraient la capacité d'envahir l'épithélium colique par passage via les cellules M ; Les bactéries phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques associées aux cellules M, induisent rapidement l'apoptose des cellules infectées et se retrouvent libres au niveau de la *lamina propria*. Elles envahissent alors les cellules épithéliales du colon par le pôle basolatéral, lysent la vacuole de phagocytose, se multiplient et induisent une très forte polymérisation d'actine cellulaire, ce qui leur permet de se propulser dans les cellules adjacentes. Tous les gènes de virulence nécessaire à l'invasion, codant un système de sécrétion de type III (TTSS) et les effecteurs Ipa (Invasion plasmidique Antigens), sont localisés sur un plasmide de virulence, d'environ 2302 kb chez les EIEC.

Les protéines effectrices, injectées via le TTSS dans la cellule hôte infectée, sont impliquées dans les réarrangements du cytosquelette, l'entrée des bactéries et la lyse de la vacuole d'endocytose. Des facteurs additionnels de virulence ont été décrits, tels que la sérine protéase Sepa, un système d'acquisition du fer de type aérobactine et d'autres protéases sécrétées. L'invasion de l'épithélium colique par les EIEC provoquerait une réaction inflammatoire intense résultant d'une libération massive d'IL-1b, consécutive à l'apoptose des macrophages infectés et d'une synthèse de cytokine chimioattractante IL-8 par les cellules épithéliales intestinales comme cela a été établi avec *Shigella*. La sécrétion de cette chimiokine stimule la migration de polynucléaires neutrophiles à travers l'épithélium intestinal. Ceci participe à la déstabilisation de l'épithélium et à la sécrétion de fluide.

1.2.6.4 E.coli entérohémorragiques (ECEH « Enterohemorrhagic E. coli » ou EHEC)

Les EHEC (ECEH) sont responsables de diarrhées aqueuses, de colites hémorragiques pouvant se compliquer d'un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les sérotypes Shiga-like ou Shiga-toxines (SLT ou Stx) sont également appelés verotoxines (VT). Les termes « E. coli producteurs de verotoxines

(VTEC) » peuvent être utilisés, mais toutes les souches productrices de Shiga-toxines ne sont probablement pas pathogènes. Leur description est récente.

Les premières épidémies associées à la consommation de steaks hachés insuffisamment cuits ont été décrites en 1982 aux Etats-Unis. Le sérotype EHEC le plus fréquemment vu en cause dans les grandes épidémies et dans la majorité des cas sporadiques est O157 :H7. D'autres sérogroupes non O157 (O26, O111, O103, O91...) ont également été impliqués dans des cas sporadiques.

Après un épisode de diarrhée aqueuse modérée, la diarrhée peut devenir sanglante, et s'accompagner de douleur abdominale sans fièvres. Cette crise hémorragique dure 2 à 10 jours. Des complications (microangiopathies thrombotiques) pouvant mettre en jeu le pronostic vital apparaissent dans 10 % des cas, et principalement chez les enfants de moins de 15 ans. Il s'agit du syndrome hémolytique et urémique (SHU) et plus rarement du purpura thrombotique thrombopénique (PTT). Le SHU est caractérisé par la triade anémie hémolytique, thrombopénie et insuffisance rénale aiguë. Il est à noter que l'antibiothérapie est déconseillée dans les infections à EHEC, car elle favoriserait une évolution vers un SHU ;

Le réservoir principal des EHEC est le tube digestif des ruminants, en particulier des bovins. La contamination humaine se produit par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, par contact direct avec les animaux et par transmission interhumaine. Entre 1982 et 2002 plus de 350 épidémies documentées impliquant O157 :H7 ont été rapportées aux Etats-Unis ; certaines ont touché plusieurs centaines voire plusieurs milliers de personnes. En France, la première grande épidémie documentée a eu lieu en octobre 2005 et était liée à la consommation de steak haché surgelé. La fréquence des cas sporadiques est probablement sous-estimée, car il n'y a pas de recherche systématique des souches EHEC de sérotype O157 :H7 ou non-O157 en routine dans les selles de patients diarrhéiques. Par contre le nombre de cas de SHU chez l'enfant de moins de 15 ans est connu grâce au réseau de surveillance coordonné par l'Institut de Veille Sanitaire ; environ 80 cas/ an, soit une prévalence de 0,7/100 000 enfants de moins de 15 ans.

Le facteur de pathogénicité principal est la production de Shiga toxines (Stx1 et/ou Stx2). Ces toxines, très proches de la toxine de *Shigella dysenteriae*, sont actives sur les cellules Véro et comportent de nombreuses variantes. Les gènes sont portés par des bactériophages. Il s'agit des toxines A/B dont la sous unité A présente une activité de type N-glycosidase sur l'ARN 28S du ribosome, ce qui entraîne un arrêt total des synthèses protéiques dans la cellule eucaryote. Les sous unités B sont responsables de la liaison au récepteur tissulaire. Le globotriosyl céramide Gb3 est présent à la surface des cellules endothéliales au niveau colique, rénal et du système nerveux central, ce qui explique les manifestations cliniques (diarrhée, insuffisance rénale, troubles neurologiques).

Lors de l'adhésion à l'épithélium intestinal, la majorité des souches EHEC sont capables de produire des lésions d'attachement-effacement similaires à celles observées lors d'infections à EPEC. Toutefois l'adhésion des EHEC se limite à l'épithélium folliculaire des plaques de Peyer au niveau du colon et du caecum. De plus, les protéines cellulaires et les voies d'activation mises en jeu lors de l'infection diffèrent de celles impliquées pour les EPEC. Enfin, d'autres facteurs potentiels de virulence ont été décrits parmi lesquels une entérohémolysine, une sérine protéase et une catalase-péroxydase.

Les EHEC peuvent induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les cellules épithéliales et endothéliales. Les flagelles jouent un rôle clé dans l'induction de synthèse d'IL-8 au niveau des cellules épithéliales intestinales. Une synthèse accrue d'IL-8 permet le développement de lésions au niveau de la barrière intestinale, ce qui favoriserait la dissémination systémique des toxines et l'évolution vers un SHU (21).

1.2.6.5 *E. coli* Entéroagréatif (ECEAg, « Enteroaggregative *E. coli* » ou EAEC)

Les EAEC (ECEAg) sont responsables à la fois de diarrhées aiguës et de diarrhées persistantes chez les enfants et les adultes. Ils sévissent dans les pays en voie de développement, mais également dans les pays occidentaux, en particulier chez les patients atteints de SIDA. Les troubles intestinaux sont voisins de ceux engendrés par les EPEC mais sont plus persistants. Les EAEC ont d'abord été classés dans un groupe comprenant des bactéries capables d'adhérer aux entérocytes et aux cellules en culture (appelés de ce fait « Enteroadhérant *E. coli* ») mais non associé à des diarrhées. Puis ils ont été individualisés car ils ont été associés à des cas indiscutables de diarrhée persistante. Ils doivent leur nom au phénotype d'adhésion agrégative en forme d' « amas de briques » à la surface des cellules en culture.

Le mécanisme pathogène mis en jeu par ces bactéries est toujours en cours d'investigation, car il existe une grande hétérogénéité des souches. Globalement, le processus infectieux fait intervenir trois étapes. En premier lieu, les bactéries adhèrent à la muqueuse intestinale par l'intermédiaire de structures protéiques filamenteuses appelées AAF pour « aggregative adherence fimbriae » ou de protéine de membrane externe appelées MAP pour « membrane-associated protein ». A partir d'un foyer primaire d'adhésion, les EAEC sont capables de créer de nouveaux foyers de colonisation par synthèse de dispersine permettant une dispersion des bactéries à la surface de la muqueuse. La deuxième étape implique une sécrétion accrue de mucus par les cellules épithéliales permettant de piéger les bactéries dans un biofilm à la surface de la muqueuse.

Ce phénomène est directement responsable de la persistance de la colonisation intestinale. L'étape finale est une induction de la réponse inflammatoire due à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, consécutives à une stimulation des cellules par la flagelline. De plus, deux toxines participeraient au pouvoir pathogène : la cytotoxine Pet impliquée dans la rupture de la barrière épithéliale et l'entérotoxine thermostable EAST (« Enteroaggregative *E. coli* heat stable enterotoxin »), très similaire à la toxine similaire thermostable ST des ETEC. Cependant la toxine EAST-1 peut être synthétisée par des souches n'appartenant pas au pathovars EAEC. Un plasmide de virulence est systématiquement retrouvé chez les EAEC et comporte la majorité des gènes codant les différents facteurs de virulences.

1.2.6.6 *E. coli* à adhésion diffuse (ECAD), « Diffusely-adhering *E. coli* » ou DAEC)

Les DAEC (ECAD) ont été d'abord classés parmi les EPEC en raison de leur sérotype et de leur présence dans les selles d'enfants atteints de diarrhées, ils doivent leur nom à leur propriété d'adhérer aux cellules épithéliales selon un phénotype d'adhésion diffuse, et sont individualisés depuis 1991. Il semblerait que seules certaines tranches d'âges parmi la population pédiatrique (48-60 mois) développent des diarrhées dues à ces souches; En outre, ces bactéries pourraient constituer un réservoir de souches responsables d'infections urinaires.

Leur pouvoir pathogène est encore controversé. Ils possèdent des déterminants de pathogénie similaires à ceux des *E. coli* responsables d'infections urinaires (UPEC) et des EAEC qui sont génétiquement très proches. Ils se répartissent en deux sous-groupes, Un premier comprend des souches qui expriment l'adhésine AIDA-1. Ces souches sont apparentées aux EPEC, possèdent l'îlot de pathogénicité LEE et sont appelés DA-EPEC. Le deuxième sous-groupe comprend des souches qui expriment une des adhésines de la famille Afa/Dr (AfaE-1 à VIII, Drl et II, F185).

Plusieurs récepteurs des adhésines Afa/Dr ont été identifiés : il s'agit du DAF « Decay Accelerating Factor », du collagène de type IV, du CEA « Carcino embryonic Antigen » et des molécules d'adhésion associées au CEA comme CEACAMI et CEACAM6. Suite à l'interaction spécifique des adhésines Afa/Dr avec le récepteur DAF, les DAEC induisent la sécrétion d'IL-8 qui s'accompagne de la migration trans-épithéliale de polynucléaires neutrophiles et également de l'expression accrue du récepteur DAF (21).

Tableau V : Principales infections dues à *E. coli*

| Infections intestinales | Infection extra-intestinales |
|---|--|
| ETEC : Syndrome cholériforme. Epidémie chez les enfants dans les pays en voie de développement | . UPEC : Infections de l'arbre urinaire, cystites, pyélonéphrites. |
| Diarrhée de voyageurs, | . Infections abdominales « para-intestinales » : appendicites, cholécystites, péritonites. |
| EPEC : Diarrhées infantiles aiguës ou chroniques. | . Autres : |
| Epidémies dans les maternités ou les crèches, | -Bactérienne, méningites néonatales |
| EIEC : Syndrome dysentérique. Diarrhées chez les adultes. | -Suppurations diverses (infections ostéo-articulaires...) |
| EHEC : Colites hémorragiques, | -Prostatites |
| Syndrome hémolytique et urémique | -Infections puerpérales |
| EAggC : Diarrhée persistantes | |

« L'exclusion des infections nosocomiales »

Tableau III : Caractéristiques des différents pathovars d'*Escherichia coli* responsables de diarrhées(23).

| Organisme | Site d'action | Maladie | Pathogénèse | Diagnostic |
|--|----------------|---|---|---|
| <i>E. coli</i> Entérotoxigène (ETEC) | Intestin grêle | La diarrhée du voyageur; diarrhée infantile dans les pays en développement; diarrhée aqueuse, vomissements, crampes, nausées, fièvre de bas grade | Plasmide, entérotoxines thermostable (ST) et thermolabile (LT) qui stimulent une hypersécrétion de fluides et d'électrolytes | La plupart des épidémies américaines causées par des souches productrices de ST; immunodosages commerciaux disponibles pour la détection de ST dans des échantillons biologiques et des cultures; Tests de PCR utilisés avec des échantillons biologiques |
| <i>E. coli</i> Entéropathogénique (EPEC) | Intestin grêle | Diarrhée infantile dans les pays en développement; diarrhée et vomissements aqueux, selles non sanglantes; considéré comme rare aux États-Unis | Histopathologie A / E médiée par des plasmides, avec perturbation de la structure des microvillosités normales entraînant une malabsorption et une diarrhée | Adhérence caractéristique aux cellules HEp-2 ou HeLa; des sondes et des tests d'amplification développés pour les cibles pili et gène formant un faisceau codés par un plasmide sur l'îlot de pathogénicité "locus of enterocyte effacement" |
| <i>E. coli</i> Enteroaggrégative (EAEC) | Intestin grêle | Diarrhée infantile dans les pays en développement et probablement développés; la diarrhée du voyageur; diarrhée aqueuse persistante accompagnée de vomissements, de déshydratation et de fièvre de bas grade | Adhérence agrégée par médiation plasmidique des bâtonnets («briques empilées») avec raccourcissement des microvillosités, infiltration mononucléaire et hémorragie; diminution de l'absorption du liquide | Adhérence caractéristique aux cellules HEp-2; Sonde d'ADN et tests d'amplification développés pour le plasmide conservé |
| <i>E. coli</i> producteur Shiga toxine (STEC) | Gros intestin | Diarrhée aqueuse initiale suivie d'une diarrhée grossièrement sanglante (colite hémorragique) accompagnée de crampes abdominales; peu ou pas de fièvre; peut évoluer vers le syndrome hémolytique et urémique | STEC a évolué à partir de l'EPEC; Lésions A / E avec destruction des microvillosités intestinales, entraînant une diminution de l'absorption; pathologie médiée par les Shiga toxines cytotoxiques (Stx1, Stx2), qui perturbent la synthèse des protéines | Screen pour O157: H7 avec gélose au sorbitol MacConkey; confirmer par sérotypage; immunodosages (ELISA, latex agglutination) pour la détection des toxines Stx dans les échantillons de selles et les bactéries cultivées; Tests d'amplification de l'ADN développés pour les gènes Stx |
| <i>E. coli</i> Enteroinvasive (EIEC) | Gros intestine | Rare dans les pays en développement et développés; fièvre, crampes, diarrhée aqueuse; peut évoluer vers la dysenterie avec de rares selles sanglantes | Invasion médiée par des plasmides et destruction de cellules épithéliales tapissant le côlon | Sérénose (test de kératoconjunctivite de cobaye); essai de plaque dans des cellules HeLa; des sondes et des tests d'amplification pour les gènes régulant l'invasion (ne peut pas faire de distinction entre EIEC et Shigella) |

A/E, Attachment/effacement; DNA, deoxyribonucleic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LT, labile toxin; PCR, polymerase chain reaction; ST, stable toxin.

1.2.7 Résistance aux antimicrobiens

E. coli est naturellement sensible aux antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif. Il est encore courant d'isoler des souches sensibles à tous ces antibiotiques. Cependant les souches résistantes sont également fréquentes. Globalement, parmi les souches isolées chez l'homme dans des produits pathologiques, au moins 50% des *E. coli* d'origine communautaire ou hospitalière sont résistantes à l'ampicilline suite à la production de pénicillinases plasmidiques. Une sensibilité à l'association amoxicilline-clavulanate est observée chez 65% des souches communautaires et 55% des souches nosocomiales. Les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) sont actives sur 98-99% des souches communautaires et 96-99% des souches isolées lors d'infections nosocomiales. La résistance aux C3G par production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) était un problème essentiellement hospitalier. Il faut cependant souligner l'émergence des souches productrices de BLSE chez les souches de *E. coli* isolées.

Parmi les aminosides, l'amikacine est le composé le plus souvent actif. Le pourcentage des souches sensibles est d'environ 98%. Ces dernières années, on a observé une diminution de la proportion des souches sensibles aux fluoroquinolones. Concernant la ciprofloxacine, le pourcentage de souches sensibles est de - 95% dans les infections communautaires et - 90% dans les infections nosocomiales. Les souches sensibles représentent environ 74 à 78% des souches isolées pour cotrimoxazole, les sulfamides et la tétracycline. Ces résistances sont, en grande majorité, d'origine plasmidique car *E. coli* peut aisément acquérir des réplicons par transfert horizontal (conjugaison). Il peut s'agir parfois de plasmides épidémiques conférant une multirésistance (21).

La thérapie antimicrobienne pour la diarrhée O157 STEC ou HUS est controversée. Une certaine publication a suggéré que cette biologie augmente le risque de HUS. Alors qu'une méta-analyse des rapports publiés n'a révélé aucun risque significativement augmenté.

Jusqu'à récemment, *E. coli* O157 : H7 ; les isolats étaient presque uniformément sensibles aux agents antimicrobiens. Cependant depuis le début des années 1990, O157 et d'autres souches STEC ont démontré des niveaux de résistance progressivement plus élevés à certains antibiotiques ; en particulier la streptomycine ; les sulfamides et la tétracycline.

Un traitement avec un antibiotique approprié peut réduire la gravité et la durée des symptômes de l'infection par EIEC. La résistance aux antimicrobiens ; en particulier à la tétracycline ; est fréquente chez les souches ETEC isolées des épidémies aux Etats Unis. Le traitement aux antibiotiques peut être utile pour la diarrhée causée par l'EPEC. La plupart des souches EPEC associées à des épidémies sont résistantes à de multiples agents antimicrobiens.

EAEC résiste à la plupart des antibiotiques ; bien que ces souches soient généralement sensibles aux fluoroquinolones. Les études ont démontré l'efficacité de la ciprofloxacine pour les voyageurs avec la diarrhée causée par EAEC.

Des petites informations sur l'efficacité du traitement antimicrobien ou la prévalence sont disponibles pour EIEC ou d'autres souches putatives de *E. coli*.

La détermination du profil de susceptibilité aux antimicrobiens peut être utile pour déterminer si les isolats sont associés à une épidémie (24).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1.3 Matériel et réactifs

1.3.1 Matériel d'analyse de laboratoire

- Microscope ;
- Bec bunsen ;
- Micropipettes ;
- Pipettes Pasteur ;
- Jarre (aérobie et anaérobie) ;
- Plaque chauffante ;
- Etuve ;
- Automates (mini API[®] - VITEK[®] 2 compact) ;
- Vortex ;
- Densitomètre ;
- Cassette VITEK[®] 2 compact ;
- Gants ;
- Embouts ;
- Lames et lamelles ;
- Tubes à hémolyse ;
- Oeses ;
- Cartes VITEK[®] 2 compact ;
- Disques pour antibiogramme ;
- Sachets anaérobies.

1.3.2 Milieux et Réactifs

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

➤ **Antibiotiques**

✓ **β-lactamines**

Amoxicilline(AMX) 25μg, Amoxicilline-acide-clavulanique(AMC) 20/10μg, Cefalotine(CFT) 30μg, Cefoxitine(CEF) 30μg, Céftazidime(CAZ) 30μg, Céfotaxime(CTX) 30 μg, Imipinèm(IMI) 10 μg, Ticarcilline (TIC) 75 μg.

✓ **Aminosides**

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

✓ **Quinolones**

Acide nalidixique(NAL) 30 µg, Ciprofloxacine(CIP) 5 µg, Norfloxacine (NOR) 15µg.

✓ **Autres**

Fosfomicine (FOS) 50 µg, Sulfaméthoxazole–Trimétoprime (TSU) 25 µg, Nitrofurantoiné (NITRO) 300 µg.

1.3.2.1 Types de prélèvement

Les différents types de prélèvement ont surtout concernés les urines, les pus, les liquides d'ascite, les hémocultures et les prélèvements urétraux.

1.3.2.1.1 Prélèvement des urines

Principe

La principale analyse des urines est l'ECBU (Examen Cytobactériologique des Urines) qui vise à la recherche des cristaux, des hématies, des leucocytes dont l'augmentation du nombre est signe d'inflammation et également la présence de germes infectieux.

1.3.2.1.2 Prélèvement des pus

Ils sont analysés pour détecter la présence des germes responsables de l'infection ou de l'inflammation.

1.3.2.1.3 Prélèvement des liquides d'ascite

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

1.3.2.1.4 Prélèvement des hémocultures

Les hémocultures sont réalisées pour détecter et identifier les germes aérobie et anaérobies, des levures chez des patients présentant une septicémie, une endocardite ou une infection bactérienne.

1.3.2.1.5 Prélèvement urétral

Le prélèvement urétral consiste à la recherche de germes responsable de l'infection en cas de suspicion d'urétrite quand l'ECBU ne montre rien ou pour rechercher une maladie sexuellement transmissible.

1.4 Matériel et Méthodes

1.4.1 Cadre d'étude

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

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

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

Le CICM comprend :

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

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

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

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

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

Source : Docteur Youssouf ISSABRE

1.4.2 Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétro-prospective menée sur deux ans (2016-2017) des résultats bactériologiques enregistrés au Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

1.4.3 Période d'étude

Elle s'étend sur une durée de deux ans : une année rétrospective (2016) et une année prospective (2017), toutes les saisons y comprises.

1.4.4 Population d'étude

La population d'étude a concerné toutes les souches d'*E.coli* isolées au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM) durant la période.

1.4.5 Echantillonnage

L'échantillonnage a porté sur un recrutement systématique de toutes les souches d'*E. coli* isolées et ayant fait l'objet d'un antibiogramme durant la période d'étude soit 197.

1.4.6 Critère d'inclusion

Ont été inclus dans notre étude toutes les souches d'*Escherichia coli* isolées, identifiées et dont l'antibiogramme a été réalisé au LRM quelles que soient la provenance et la nature du produit pathologique.

1.4.7 Critère de non inclusion

Toutes les souches n'appartenant pas au genre *E.coli* et/ou les souches isolées en dehors de la période d'étude.

1.4.8 Souches étudiées

Dans notre travail nous avons étudié 197 souches d'*Escherichia coli* isolées à partir des prélèvements pathologiques des services du CICM. Ces prélèvements ont surtout concernés les urinaires, les pus, les liquides d'ascite, les hémocultures et les prélèvements urétraux.

1.4.9 Etude microbiologique

1.4.9.1 Examen macroscopique

Il a consisté à donner la couleur et l'aspect de l'échantillon

1.4.9.2 Examen microscopique

Il port sur :

✓ **L'état frais**

Variable selon le type de prélèvement

On cherche la présence de leucocytes, de cristaux, de cellules épithéliales, d'hématies, des kystes, des *Trichomonas vaginalis* et des parasites.

✓ **L'état d'après coloration**

Les échantillons sont fixés sur lame et colorés au Gram pour l'observation microscopique. La coloration de Gram est la coloration de base en bactériologie et elle permet de mettre en évidence la forme (cocci) et le type (Gram négatif ou positif) de la bactérie.

Technique

. Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succède et consiste à :

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

Lecture

E. coli apparait comme des bâtonnets (bacilles) de coloration rose. Elles sont dites bacille à Gram négatif.

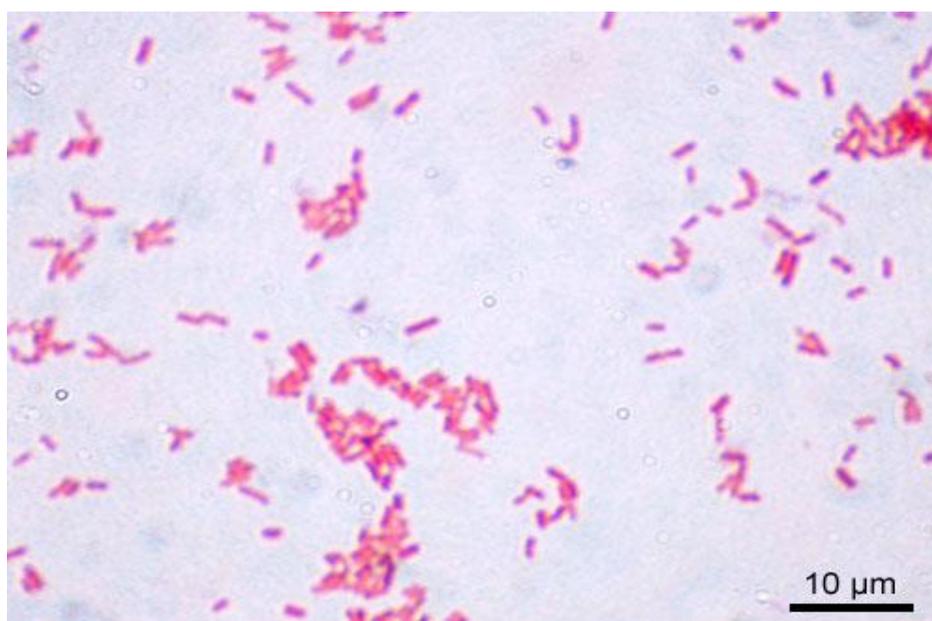


Figure 2 : *Escherichia coli* après coloration de Gram-Wikipédia (25).

1.4.9.3 Culture

La culture est effectuée sur différents milieux selon le produit pathologique en déchargeant par stries condensés l'écouvillon de prélèvement sur toute la surface de la boîte gélosée et mis en incubation pendant 24 heures à 37°C.

Uriselect4 et Drigalski ont constitué nos différents milieux de culture.

1.4.9.3.1 Gelose uriselect4

C'est un milieu chromogène permettant :

L'isolement et la numération de tous les germes urinaires par une méthode d'ensemencement à l'osee calibrée.

L'identification directe s'opère par mise en évidence d'activités enzymatiques, des bactéries les plus fréquemment responsables d'infections urinaires : *E. coli*, *Proteus*, Entérocoques.

L'orientation diagnostique pour les autres germes urinaires, en particulier les entérobactéries du groupe K.E.S (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*).

L'identification d'*E. coli* est réalisée par la mise en évidence de l'activité de 2 enzymes : la β galactosidase et le tryptophane. Le clivage par la β galactosidase du 1^{er} substrat chromogène contenu dans le milieu, entraîne la coloration en rose des colonies.



Source : Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Figure 3 : Aspect des colonies d'*Escherichia coli* sur Uriselect4

1.4.9.3.2 Gelose Drigalski

C'est un milieu sélectif permettant l'isolement des bactéries Gram négatif non exigeantes. Il permet de faire la différence entre les espèces qui fermentent le lactose de celles qui ne le fermentent pas. Les colonies de bactéries lactose positifs apparaissent jaunes et celles négatifs apparaissent bleues.



Source : Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Figure 4 : Aspect des colonies d'*Escherichia coli* sur Drigalski

✓ **Observation**

Après 24h d'incubation à 37°C, les colonies d'*Escherichia coli* apparaissent roses sur Uriselect4 et jaunes sur le Digalski comme décrit dans les figures 3 et 4.

✓ **Identification**

Les colonies caractéristiques font l'objet d'identification après ou sans ré isolement selon la pureté observée à la culture.

Les identifications sont donc faites à partir des tests biochimiques et métaboliques (test d'oxydase, galerie Api 20E et Viteck 2 compact).

- Test d'oxydase
Le test d'oxydase est un examen rapide, utilisé pour identifier les bactéries Gram-négatifs. Cet examen est utilisé comme un indicateur redox qui passe d'une teinte incolore (quand c'est réduit) à une couleur violet-foncé (quand c'est oxydé). Les bactéries qui possèdent le cytochrome C sont capables d'éliminer des électrons (oxyde) de cet indicateur redox, cause pour laquelle la couleur change.
- Galerie Api 20E
La galerie Api 20 E est utilisée pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles Gram négatifs qui poussent facilement. Elle comporte 20 microtubes qui sont inoculés avec une suspension bactérienne, incubé pendant la nuit dans un indicateur en aérobiose. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou après ajout des réactifs de révélation.
- Viteck 2 compact

L'identification et l'antibiogramme sont réalisés sur le VITEK® 2 compact



Source : Laboratoire Rodolphe Mérieux (LRM).

Figure 5 : L'automate VITEK® 2 compact

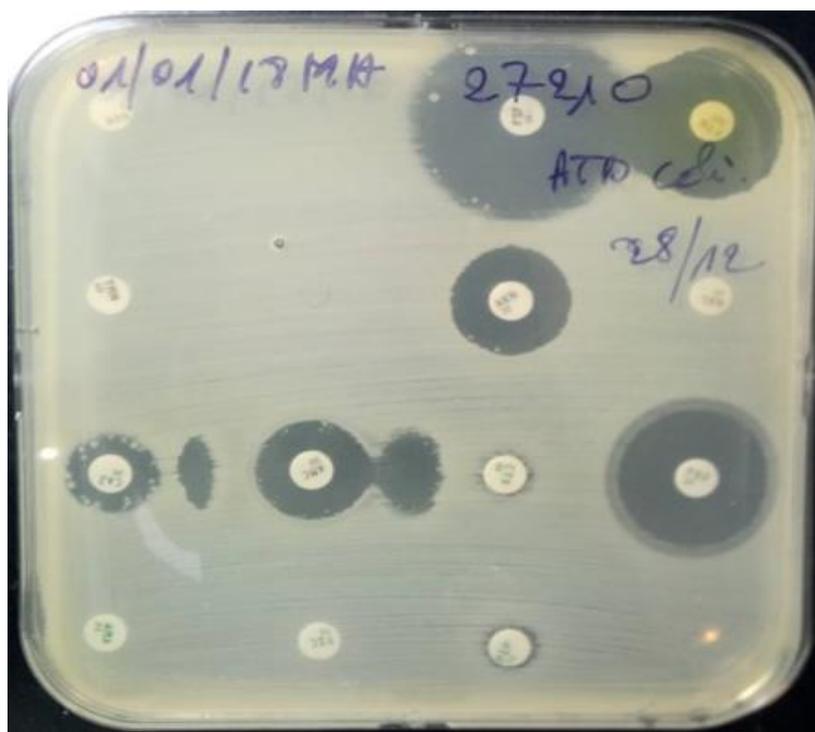
1.4.10 Test de sensibilité aux antibiotiques : Méthode de diffusion des disques d'antibiotiques selon Kirby-Bauer

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

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

✓ Matériels et réactifs utilisés :

- Gélose de Mueller-Hinton additionnée de 5% de sang de cheval (MHA-B)
- Solution saline stérile à 0,85%
- Standard 0,5 de Mc Farland
- Disques antibiotiques pour test de sensibilité
- Ecouvillons en coton stériles
- Pipettes à sérum
- Pincettes à disques et/ ou applicateur de disque



Source : Image du Laboratoire Rodolphe Mérieux

Figure 6 : Un antibiogramme

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

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

- **Principe**

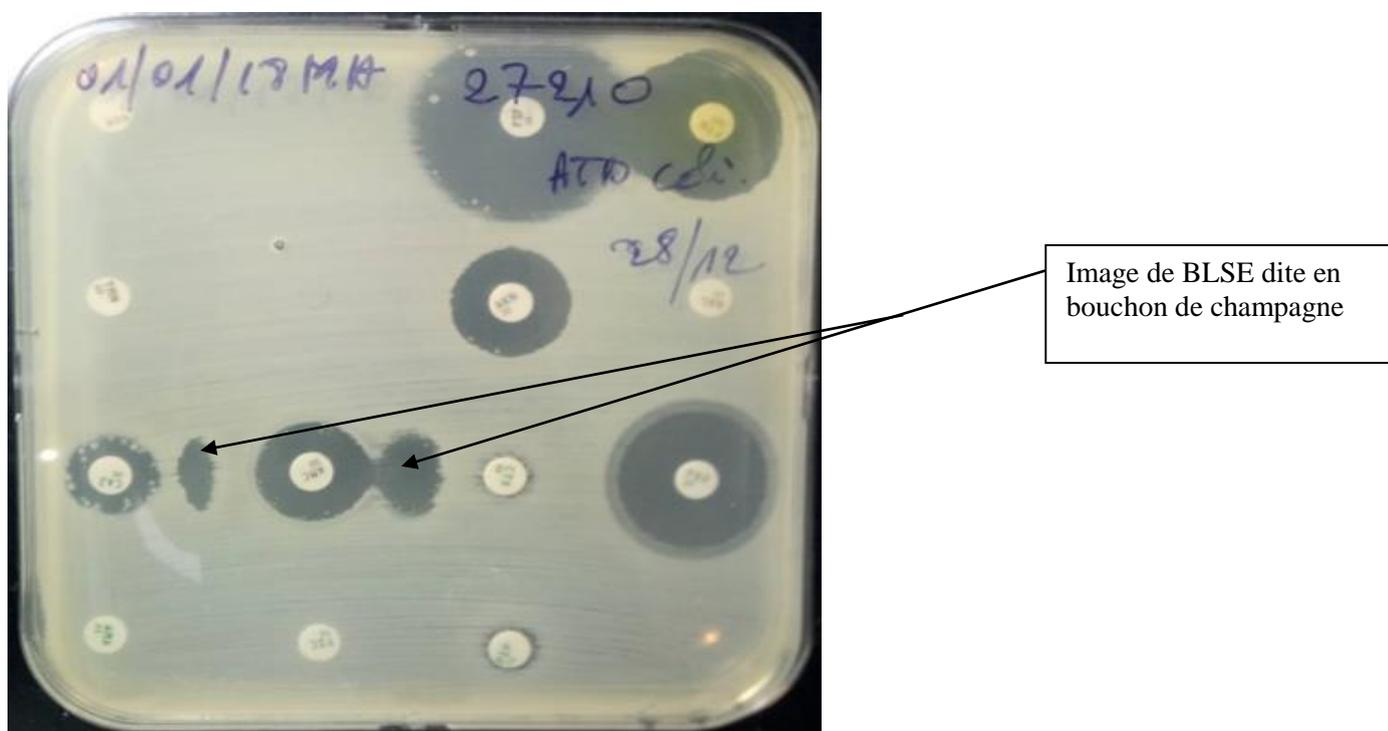
Le test de synergie permet la détection de BLSE chez une souche donnée. L'action de ces enzymes peut être mise en évidence par la méthode de diffusion sur disques, consistant à rechercher une image de synergie entre un disque d'antibiotique contenant un inhibiteur de β -lactamase et les disques de céphalosporines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

- **Technique**

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

- **Lecture**

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



Source : Souche d'*E. coli* isolée de prélèvement urinaire

Provenant d'une structure de santé communautaire.

Image du Laboratoire Rodolphe Mérieux.

Figure 7 : Image d'ATB d'*Escherichia coli* productrice de BLSE

1.4.12 Variables étudiées

Les variables étudiées sont :

- ✓ le sexe,
- ✓ la provenance des souches,
- ✓ le type de prélèvement,
- ✓ la période (saison fraîche, saison sèche, saison pluvieuse),
- ✓ le profil de résistance aux antibiotiques testés,
- ✓ les phénotypes de résistances.

1.4.12.1 Collecte de données

Les données ont été collectées à partir des fiches d'antibiogramme comportant outre le numéro d'identification, les souches isolées, la nature des prélèvements, le sexe, la provenance des souches ainsi que les antibiotiques testés.

1.4.12.2 Analyses et traitement des données

Les données ont été saisies et analysées sur Epi Info version 7.2.1.0, Microsoft Word et Excel 2013 utilisés pour l'élaboration des tableaux.

Résultats

Résultats globaux

Fréquence d'isolement des bactéries à Gram négatifs durant la période d'étude

Durant la période d'étude, 402 bactéries à Gram négatifs ont été isolées au LRM dont 370 entérobactéries et 32 autres (*Acinetobacter*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Neisseria* et *Pseudomonas*).

Les figures 8 et 9 résument les fréquences d'isolement des différentes souches de bactéries.

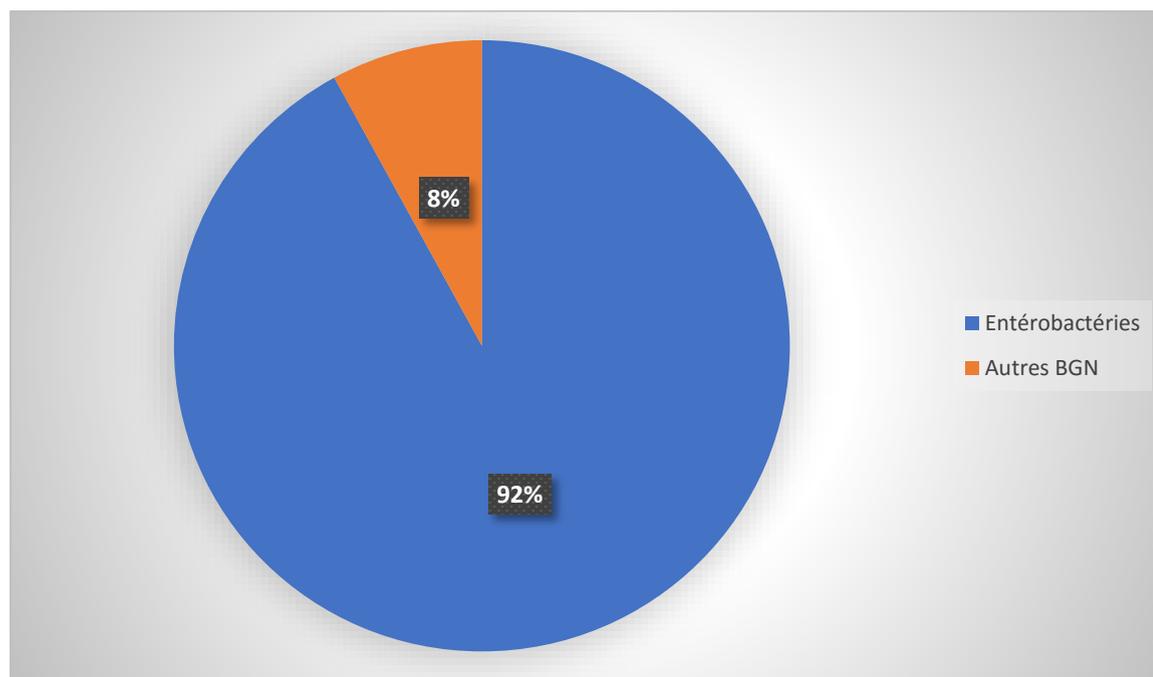


Figure 8 : Répartition globale des bactéries isolées et identifiées

Les entérobactéries représentaient 92% des bactéries à Gram négatifs isolées.

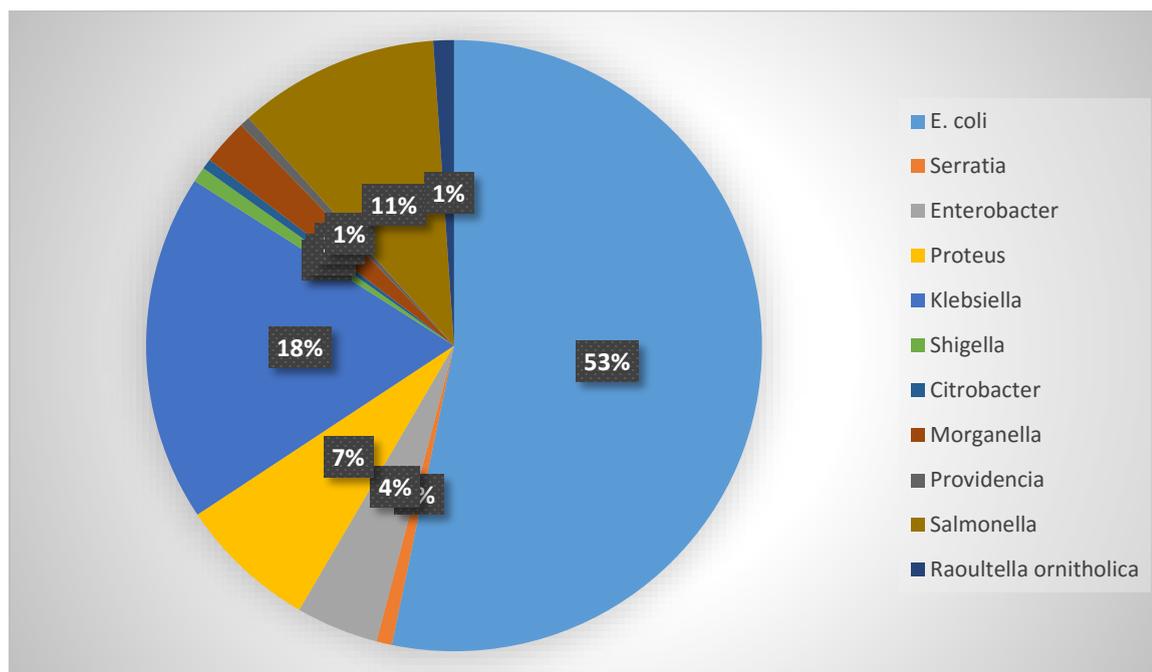


Figure 9 : Pourcentage des souches de *E. coli* par rapport aux autres entérobactéries

Durant notre période d'étude *Escherichia coli* représentait 53% des entérobactéries isolées.

Tableau III : Répartition des souches selon le genre de 2016 à 2017

| Germes | Effectifs Entérobactéries | Pourcentage |
|-------------------------------|---------------------------|-------------|
| Enterobacteriaceae | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 197 | 49 |
| <i>Serratia</i> | 3 | 0,07 |
| <i>Enterobacter</i> | 16 | 3,98 |
| <i>Proteus</i> | 27 | 6,72 |
| <i>Klesiella</i> | 68 | 16,92 |
| <i>Shigella</i> | 3 | 0,75 |
| <i>Citrobacter</i> | 2 | 0,50 |
| <i>Morganella</i> | 9 | 2,24 |
| <i>Providencia</i> | 2 | 0,50 |
| <i>Salmonella</i> | 39 | 9,70 |
| <i>Raoultella ornitholica</i> | 4 | 1 |
| Autres | | |
| <i>Acinetobacter</i> | 13 | 3,23 |
| <i>Pseudomonas</i> | 12 | 2,98 |
| <i>Bulkholderia</i> | 1 | 0,25 |
| <i>Neisseria</i> | 4 | 1 |
| <i>Bordetella</i> | 2 | 0,50 |
| Total | 402 | 100 |

Escherichia coli était le germe le plus représenté soit 197 (49%) souches sur 402 souches bactéries à Gram négatifs isolées.

Résultats analytiques du genre *E. coli*

La répartition des 197 souches d'*Escherichia coli* selon l'origine et le type de prélèvement est résumée dans le tableau XIII et la figure 10.

Tableau IV : Répartition des 197 souches d'*E.coli* selon l'origine du prélèvement

| Origine | Effectif | Pourcentage (%) |
|---------------------------|------------|-----------------|
| Structures communautaires | 114 | 57,86 |
| Structures hospitalières | 34 | 17,25 |
| Autres structures | 49 | 24,87 |
| Total | 197 | 100 |

La majorité des patients infectés par *E. coli* provenait des structures de santé communautaire avec 57,86%.

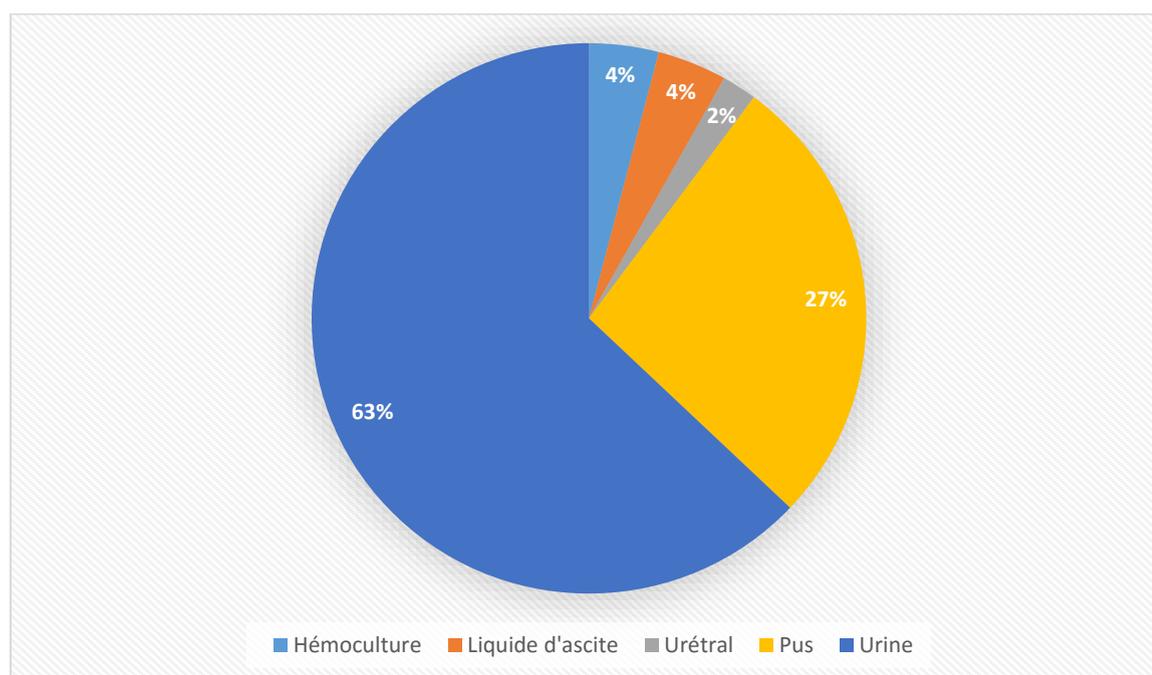


Figure 10 : Répartition des 197 souches d'*E. coli* selon le type de prélèvement

Les souches d'*Escherichia coli* étaient fréquemment isolées des urines (63%)

Le plus faible pourcentage a été observé dans les prélèvements urétraux 2%.

Fréquence des infections à *Escherichia coli* selon le sexe

Parmi les 197 souches isolées, le sexe masculin prédominait avec un pourcentage de 51,27 contre 48,73 pour les femmes.

Un sexe ration de 1,05 a été observé.

Tableau V : Répartition du sexe en fonction du type de prélèvement

| Sexe | Hémoculture | Liquide d'ascite | Urétral | Pus | Urines |
|-------|-------------|------------------|---------|-------|--------|
| Homme | 50 | 87,50 | 100 | 62,26 | 42,74 |
| Femme | 50 | 12,50 | 00 | 37,74 | 57,26 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

57,26% des infections urinaires dans notre étude provenaient des femmes et 42,74% du sexe masculin.

Tableau VI : Répartition des souches d'*Escherichia coli* selon la période

| Période | BGN | Effectif <i>E. coli</i> | Pourcentage <i>E. coli</i> |
|---------|-----|-------------------------|----------------------------|
| 2016 | 113 | 129 | 63 |
| 2017 | 92 | 68 | 33,17 |
| TOTAL | 205 | 197 | 100 |

E. coli a été plus isolé en 2016 qu'en 2017 soit 63% contre 33,17%.

Profil de résistance aux antibiotiques

Profil de résistances aux principaux antibiotiques testés

Les souches d'*Escherichia coli* ont été testées à différentes familles d'antibiotiques notamment les β -lactamines, les aminosides, les quinolones.

Tableau VII : Fréquence de la résistance des souches d'*Escherichia coli* aux antibiotiques testés

| Antibiotiques testées | Sensibles | Résistants | Totaux |
|------------------------|-----------|--------------|--------|
| Beta-lactamines | | | |
| AMOX | 29 | 164 (84,97%) | 193 |
| AMC | 90 | 90 (50%) | 180 |
| TIC | 30 | 162 (84,37%) | 192 |
| CEF | 131 | 31 (19,14%) | 162 |
| CFT | 21 | 115 (84,56%) | 136 |
| CAZ | 90 | 100 (52,63%) | 190 |
| CTX | 57 | 76 (57,14%) | 133 |
| IMI | 163 | 3 (1,81%) | 166 |
| Aminosides | | | |
| GEN | 105 | 61 (36,74%) | 166 |
| TOB | 89 | 71 (44,38%) | 160 |
| AKN | 119 | 32 (21,2%) | 151 |
| KAN | 1 | 0 (00%) | 1 |
| Quinolones | | | |
| NAL | 53 | 123 (69,89%) | 176 |
| NOR | 35 | 44 (55,69%) | 79 |
| CIP | 63 | 74 (58,73%) | 126 |
| Autres | | | |
| TSU | 23 | 134 (85,35%) | 157 |
| NITRO | 52 | 0 (00%) | 52 |
| FOS | 59 | 3 (4,84%) | 62 |

La fréquence de la résistance des souches d'*Escherichia coli* à chacune des différentes familles d'antibiotiques testées est résumée dans les figures 12,13 et 14.

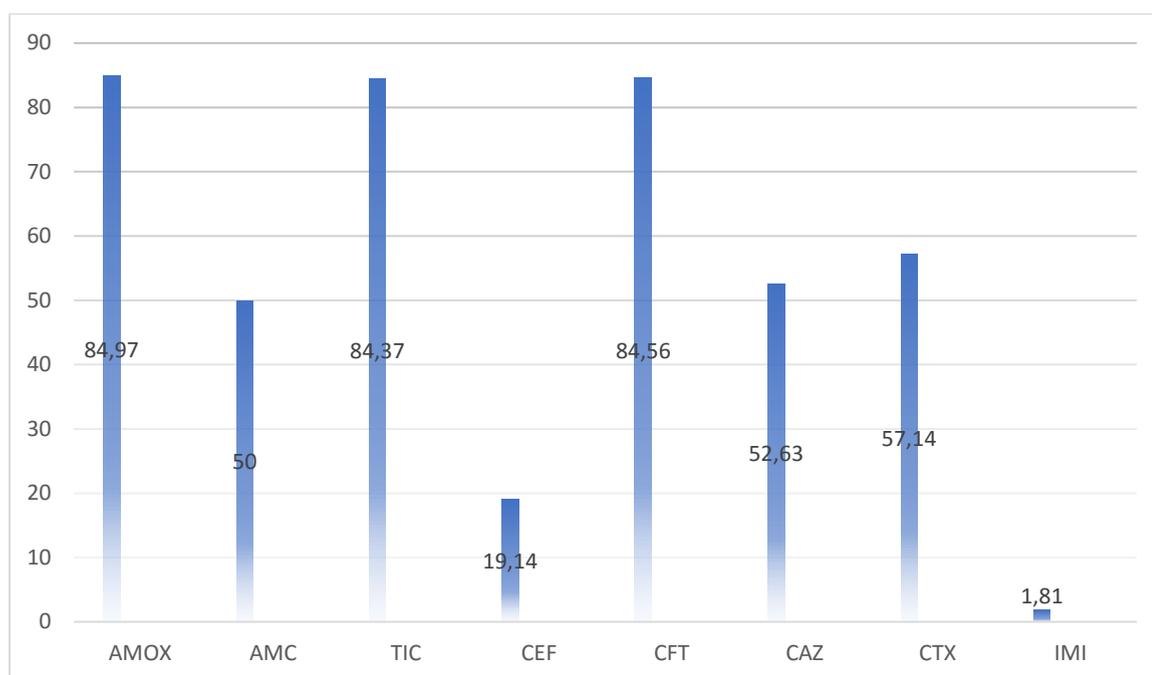


Figure 11 : Fréquence de résistance des souches d'*Escherichia coli* aux betalactamines

Les résistances les plus élevées ont été observées à l'amoxicilline (84,97%), à la cefalotine (84,56%) et à la ticarcilline (84,37%)

Les résistances les plus faibles étaient observées à la céfoxitine (19,14%) et à l'imipénème (1,81%).

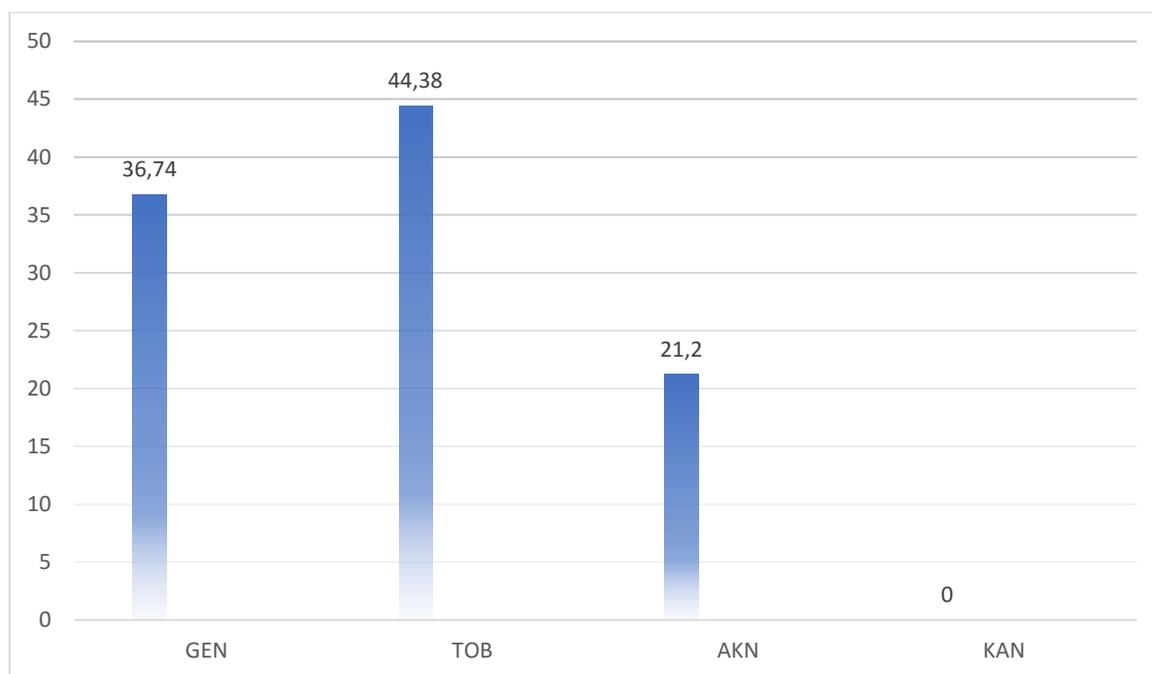


Figure 12 : Fréquence de résistance des souches d'*Escherichia coli* aux aminosides

Un taux de résistance de 44,38% a été observé à la tobramicine, 36,74% à la gentamicine et 21,2% à l'amikacine. Aucune résistance n'a été observée vis-à-vis de la kanamicine.

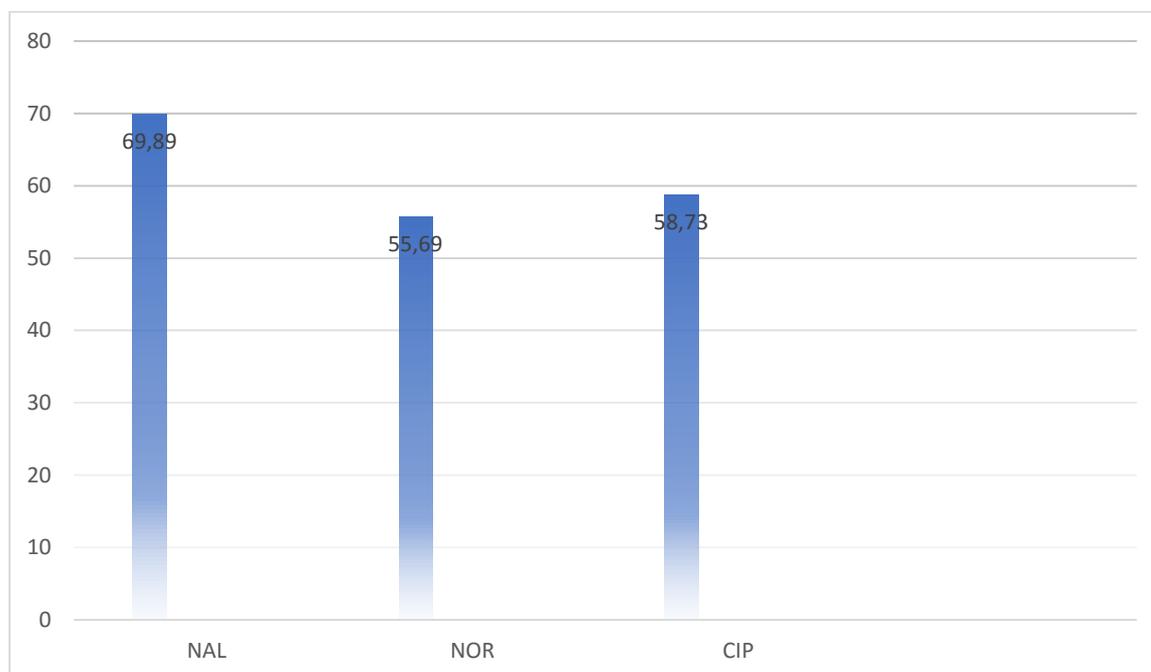


Figure 13 : Fréquence de résistance des souches d'*Escherichia coli* aux quinolones

Pour les quinolones, *E. coli* présentait des taux de résistances respectifs : 69,89% à l'acide nalidixique, 55,69% à la norfloxacin et 54,01% à la ciprofloxacine.

Profil de résistances aux autres antibiotiques

Un taux de résistance de 85,35% a été observé à la cotrimoxazole qui n'est pas le cas de celui de la nitrofurantoïne et de la fosfomicine, lesquelles présentaient des taux de résistance respectifs de 0% et 4,84%.

Phénotypes de résistance de *E. coli* aux antibiotiques

La figure 15 et le tableau XIV sont représentatifs des phénotypes de résistance de *E.coli* aux familles d'antibiotiques (Betalacmines et Quinolones).

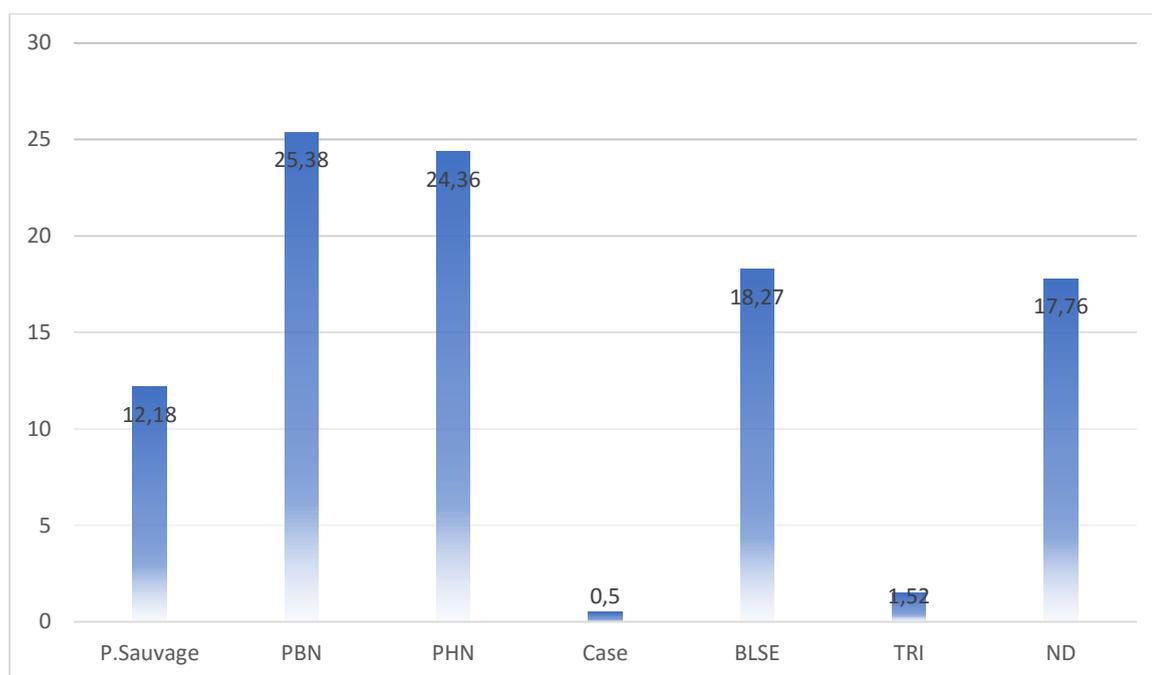


Figure 14 : Phénotypes de résistances aux bêta-lactamines

Les PBN étaient majoritaires avec 25,38%.

Le tableau XII et XIII nous montre une répartition des bêta-lactamases selon la nature du produit pathologique et la provenance des souches.

Tableau VIII : Répartition des bêta-lactamases selon les types de prélèvements

| Types de prélèvement | P.Sauvage% | PBN% | PHN%% | CASE% | BLSE% | TRI% | ND% |
|----------------------|------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Hémoculture | 00 | 4 | 4,17 | 00 | 8,33 | 33,33 | 00 |
| Liquide d'ascite | 4,17 | 4 | 4,17 | 00 | 2,78 | 33,33 | 2,86 |
| Prélèvement urétral | 8,33 | 2 | 00 | 00 | 00 | 00 | 00 |
| Pus | 41,67 | 22 | 16,67 | 100 | 30,56 | 00 | 20 |
| Urine | 45,83 | 68 | 75 | 00 | 58,33 | 33,33 | 77,14 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

La majorité des souches isolées des prélèvements urinaires était productrice de bêta-lactamase 58,33%.

Tableau IX : Répartition des betalactamases selon la structure de santé

| Structures | P.Sauvage (%) | PBN (%) | PHN (%) | CASE (%) | BLSE (%) | TRI (%) | ND (%) |
|-------------------|---------------|---------|---------|----------|----------|---------|--------|
| Communautaires | 70,83 | 28 | 22,92 | 00 | 38,89 | 00 | 51,43 |
| Hospitalières | 00 | 24 | 20,83 | 100 | 30,56 | 00 | 22,86 |
| Autres structures | 29,17 | 48 | 56,25 | 00 | 30,56 | 100 | 25,71 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Les souches isolées des échantillons en provenance des structures de santé communautaire exprimaient plus de BLSE 38,89%.

Tableau X : Les phénotypes de résistance d'*E.coli* aux quinolones

| Phénotypes Quinolones | Effectifs | Pourcentage |
|-----------------------|-----------|-------------|
| I "Sauvage" | 6 | 21,43 |
| II | 7 | 25 |
| III | 1 | 3,57 |
| IV | 14 | 50 |
| TOTAL | 28 | 100 |

50% des phénotypes de résistance appartenaient au groupe IV.

Dans la majorité des cas des résultats le nombre des quinolones requises à tester pour une analyse des phénotypes de résistance n'était pas disponible.

Tableau XI : Phénotypes de résistances des ND

| Phénotypes ND | Effectif | Pourcentage |
|---------------|----------|-------------|
| NAL® | 92 | 53,49 |
| NOR® | 21 | 12,21 |
| CIP® | 59 | 34,30 |
| Total | 172 | 100 |

La résistance la plus élevée a été observé à l'acide nalidixique 53,49%.

Discussion

Notre étude s'est déroulée de Janvier 2016 à Septembre 2017, période sur laquelle 402 souches bactériennes ont été isolées et identifiées. Des prélèvements urinaires, urétraux, de pus, de liquide d'ascite, et de sang (Hémocultures) parmi lesquelles 370 (92%) entérobactéries dont 197 (49%) souches d'*Escherichia coli* ont été également opérés. Ces données concordent avec les résultats d'une étude faite à Marrakech entre 2013 et 2015 avec une proportion de 41% par rapport à l'ensemble des bactéries à Gram négatif (26) et ceux d'une autre effectuée à l'hôpital général de Douala de 2005 à 2012 avec une proportion de 48,5% (27).

Données épidémiologiques

Nature des résultats selon les prélèvements réalisés

Au cours de ce travail, une prédominance de l'isolement de *E. coli* dans les infections urinaires a été observée avec 62,94% comparable aux taux rapportés par Diarra S. (62%) au LRM en 2015 (6) et Chamard B. (62,5%) à Paris en 2013 (28).

Dembélé J. au CHU du point G a observé un taux de 70% en 2015 (29).

Cette prédominance s'explique par le fait que les urines constituent un milieu propice pour un foyer infectieux et *Escherichia coli* est le principal micro-organisme impliqué dans les infections urinaires.

Fréquence de l'infection

Selon le sexe

Nous avons observé une légère prédominance du sexe masculin avec 51% et 49% pour les femmes.

Une étude réalisée au sud du Bénin entre mai et décembre 2015, a montré des résultats similaires soit 52% du sujet masculin contre 48% pour les femmes (30).

Selon le type de prélèvement

Cinquante-sept virgule vingt-six pour cent (57,26%) des infections urinaires dans notre étude provenaient du sexe féminin et 42,74% du sexe masculin.

Cette valeur se rapproche de celle d'une étude menée en Algérie en 2017 ou 61% des infections provenaient du sexe féminin et 39% du sexe masculin. Cette prédominance féminine peut s'expliquer par les caractéristiques anatomiques de l'urètre féminin qui est court, large, droit et proche de la région péri- anale, les grossesses, la ménopause et le manque d'hygiène qui constituent les facteurs favorisant (31).

Fréquence de l'infection selon les structures de santé

Durant la période de l'étude 57,86% des souches étaient d'origine hospitalière, 17,25% d'origine communautaire et 24,87% en provenance d'autres structures sanitaires. Ces données peuvent s'expliquer par le fait que le CICM reçoit beaucoup plus de demande des hôpitaux que les autres structures.

Résistances aux antibiotiques des souches d'*Escherichia coli*

La majorité de nos souches exprimait une résistance très élevée aux betalactamines

La résistance à l'amoxicilline était de 84,97%, 84,56% à la céfalotine, 84,37% à la ticarcilline, 57,14% à la cefotaxime, 52,63% à la ceftazidime et 50% à l'amoxicilline-acide clavulanique

En 2015 au LRM,

- Diarra S. a observé une résistance de 79% à la ticarcilline, 74% à la cefalotine, 63% à la ceftazidime et 30% à la cefotaxime (6).
- Des taux de résistance beaucoup plus élevés ont été observés par ZITTI en 2013 à l'amoxicilline et l'association amoxicilline-acide clavulanique est d'ordre de 91,6% et 92,4% (32)

Cannard M.B. à Dijon avait observé sur une période de 11 ans allant du 1^{er} janvier 2004 au 31 décembre 2014 une résistance aux aminopenicillines de 61,3% (33).

A travers ces données, nous constatons que les pénicillines ainsi que les céphalosporines, ont quasiment atteint des niveaux de résistance élevés posant ainsi des sérieux problèmes de prise en charge des infections à *E. coli*.

L'imipénème a montré une bonne activité sur la quasi-totalité des souches testées (98%).

Durant la période d'étude nous avons trouvé 18% de souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE, 25% de PBN, 24% de PHN, 12% de P.Sauvage, 1,7% TRI et 0,5% CASE.

Une étude faite à Madagascar de Janvier 2014 à Décembre 2016 a abouti à des souches d'*Escherichia coli* sécrétrices de BLSE soit 22,5%, 14,7% étaient productrices de PBN, 5,9% concernait les phénotypes sauvages et 50% étaient productrices de PHN (34).

Timbiné LG a observé en 2014 25% des souches productrices de BLSE, 22% PHN, 15% PBN et 15% TRI (35).

A Yaoundé en 2012, 27,1% des souches était productrices de PHN, 12,6% PBN et 12,6% BLSE (36)

En Algérie Nouria L. a observé en 2012 9% des souches d'*Escherichia coli* productrices de BLSE 0,3% d'*E.coli* productrice de phénotype CASE a été observé au CHU PTG en 2007 (37).

Entre 2011 et 2013, 4% TRI a été observé en France (38).

Dans 17,76% des cas, les phénotypes étaient non déterminés du fait que tous les antibiotiques n'étaient pas testés en même temps chez les différents patients.

Si les bactéries multi-résistantes concernaient jadis surtout le milieu hospitalier, de nos jours elles sont aussi retrouvées en milieu communautaire, notamment dans les infections urinaires. Cela s'explique par leur pouvoir de diffusion à l'entourage facilité par la transmission manu portée.

Durant notre période d'étude, les souches isolées dans les échantillons des patients en provenance des structures communautaires exprimaient un peu plus de BLSE soit 38,89%.

Cent pour cent (100%) des phénotypes CASE et TRI observés provenaient respectivement du milieu hospitalier et d'autres structures de santé.

Les aminosides présentait des taux de résistance de l'ordre de 44,38% à la tobramicine, 36,74% à la gentamicine, 21,2% à l'amikacine

Nos résultats sont similaires à ceux observés au LRM en 2014 par T.J.Z. ZITTI où 45% de résistance ont été enregistrés à la tobramicine, 42% à la gentamicine et 20,6% à l'amikacine (32)

La résistance à l'amikacine, a évolué de 10,2% à 14,1% entre 2005 et 2012 à l'Hôpital de Douala Awa Ndir a trouvé en 2015 au Sénégal un taux de résistance de 82% à la gentamicine et 40% à l'amikacine (39).

L'amikacine qui était l'aminoside le plus actif sur les entérobactéries a présenté une baisse de son activité au fil des années. Cette molécule est de plus en plus utilisée à cause de l'inefficacité des autres aminosides (gentamicine, tobramycine et netilmicine), notamment dans les infections sévères en néonatalogie.

La prévalence des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux quinolones et FQ a atteint des chiffres inquiétants, soit 69,89% à l'acide nalidixique, 58,73% à la ciprofloxacine et 55,69% à la norfloxacine

Une étude menée à l'Hôpital de Lagouat en Algérie, en 2015 a observé des taux de résistance assez similaire soit 54 % à l'acide nalidixique, 46 % à la ciprofloxacine et 69% à la norfloxacine (40)..

L'utilisation en première intention et de façon irrationnelle des FQ comme traitement probabiliste pourrait justifier l'émergence de la résistance aux Quinolones.

Le cotrimoxazole présentait un taux de résistance de 85,35%. Cette valeur est supérieure à celle de Diarra S. qui avait trouvé en 2015 un taux de résistance de 76%, d'où l'inefficacité de cette molécule dans le traitement des infections à *E. coli*

Une excellente activité de la nitrofurantoïne et de la fosfomicine se fait remarquer sur les souches d'*Escherichia coli* soit un taux de sensibilité de 100% et 95,16%.

Conclusion

L'émergence de la résistance aux antibiotiques engendre de graves conséquences sanitaires et économiques. Elle est responsable d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité, de la durée d'hospitalisation et conduit à utiliser des médicaments plus onéreux et souvent plus toxiques.

Escherichia coli est l'une des causes les plus fréquentes de bactériémies et d'infections des voies urinaires communautaires et nosocomiales à travers le monde.

Cette étude a montré qu'un grand nombre de ces souches ont exprimé un taux élevé de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques notamment les betalactamines, les aminosides et les quinolones. L'imipénème, la fosfomycine et la nitrofurantoïne restent les molécules les plus actives.

Recommandations

✓ **Au Centre d'Infectiologie Charles Mérieux (CICM)**

Veiller à l'utilisation de toutes les différentes classes d'antibiotiques recommandées à tester sans exception, pour une analyse phénotypique plus formelle des souches.

✓ **Aux autorités sanitaires**

Réduire le cout de l'examen cyto bactériologique des urines plus antibiogramme afin d'en faciliter l'accès
Déployer des moyens d'études et de sensibilisation pour le suivi de la multirésistance.

✓ **Aux prescripteurs et pharmaciens d'officine**

Eviter la prescription massive des fluoroquinolones et céphalosporines de troisième génération, car ils favorisent l'émergence de la résistance bactérienne

Prescrire un antibiogramme avant toute antibiothérapie

Sensibiliser les patients sur la bonne prise des antibiotiques.

✓ **A la population**

Eviter l'automédication.

Références

1. Système mondiale de surveillance de la résistance aux antimicrobiens : manuel de mise en oeuvre initiale. 2016.
2. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Nov 2016;2.
3. Résistances aux antimicrobiens. 2015.
4. Résistance aux antibiotiques [internet]. Institut Pasteur. 2017 [cité 8 mai 2018]. Disponible à : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>
5. O.Belmonte, D.Drouet, J.Alba. Evolution of enterobacteriaceae resistance to antibiotics in Reunion island: emergence of extended spectrum beta-lactamase. Elsevier. Févr 2010;18-24.
6. Diarra S. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'Escherichia coli isolées au centre d'infectiologie Charles Mérieux Mali de 2012 à 2015. Faculté de pharmacie;
7. Sylla Mamadou Baba. Infections invasives à Escherichia coli dans le service de pédiatrie du CHU Gabriel Toure Bamako. Faculté de pharmacie; 2005.
8. Carmen Lucia Pessoa. Résistance aux antimicrobiens: ensemble nous pouvons réduire ce risque. Débats de santé publique présenté à; 2014.
9. Christian Brun-buisson. Consommation d'antibiotique et résistances aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Nov 2016;
10. Fauchère J Louis, avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Paris: ellipses; 2002. 365 p.
11. Freney J, Girardo P, Freydière AM, Renaud FN. Entérobactéries. Juin 2008;(90-5-135).
12. Ferron A. Bactériologie médicale. 15^e ed. C et R; 157-163 p.
13. Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Monteil H. Bactériologie clinique. 3^{ème}. Paris: ellipses édition marketing s.a.; 2000. 171-173 p.
14. Farmer III JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae: introduction and identification. Dans: manual of clinical microbiology. 9^{ème}. Patrick R. Murray; 2007. P. 649-66.
15. Bonnet R. Beta-lactamines et entérobactéries. Dans: antibiogramme. 3^{ème}. Paris: eska; 2012. P. 165-88.
16. Chap3-pratique- atb-vf.pptx.
17. Freney J, Croze M. Enterobacteriaceae- généralité. Dans: précis de bactériologie clinique. 2^{ème}. Paris: eska; 2007. P. 979-87.
18. F B. Conservation des bactéries. Dans: précis de bactériologie clinique. Eska 2007. P. 729-33. (2^{ème} édition).

19. *Escherichia*. Dans: wikipédia [internet]. 2017. Disponible a:
<https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=escherichia&oldid=143549132>
20. Freney J, renaud F, Bansen w, Bollet c. Précis de bactériologie clinique. Eska. Paris; 2000.
21. Freney J, Renaud F, Leclercq r, Riegel p. Précis de bactériologie clinique. Eska 2007. Paris; (2ème).
22. Nataro JP, bopp ca, field pi. Echerichia, shiguella, and salmonella. Dans: manual of clinical microbiology. 9ème. Patrick r. Murray - ellen jo baron; 671.
23. Murray, rosenthal, pfaller. Enterobacteriaceae. Dans: medical microbiologie. 8ème. Elsevier; p. 256.
24. Nataro JP, bopp ca, field pi. Esherichia, shigella, salmonella. Dans: mannual of clinical microbiology. 9ème. Patrick r. Murray - Ellen Jo Baron; p. 676,677.
25. Coloration de gram. Dans: wikipédia [internet]. 2018. Disponible a:
https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=coloration_de_gram&oldid=144366464
26. Zahir Hanana. L'infection urinaire chez l'enfant au chu de marrakech : ecologie microbienne et sensibilité aux antibiotiques. [2013-2015]: faculté de médecine et de pharmacie-marrakech;
27. Celine okalla ebongue, dieudonne adiogo, jean pierre nda mefo'o. Evolution of antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated at the douala general hospital from 2005 to 2012.
28. Boyer Chamard Timothée Antoine Philippe. Lutte contre les bactéries multi-résistantes en ville : état des lieux et moyens mis en oeuvre après une hospitalisation. Paris dideront-paris 7; 2013.
29. Dembélé J. Infection nosocomiales dans le service des maladies infectieuses du chu point g. Faculté de pharmacie; 2014.
30. Implication de souches de escherichia coli productrices de shigo-toxines dans les épisodes de diarrhées chez les enfants du sud-bénin. Journal of applied biosciences 101:9576-9577. Mai 2016;9571.
31. Fathi rania. Etude du profil bactériologique et de la sensibilité aux antibiotiques responsables des infections urinaires. Frère mentouri constantine; 2016.
32. Zitti Tjz. Mise en place de la surveillance des résistances aux antibiotiques des germes responsables d'infections urinaires dans le laboratoire rodolphe mérioux de bamako. Faculté de pharmacie; 2013.
33. Margot Bannelier Cannard. Résistances aux antibiotiques de e.coli dans les infections urinaires de l'enfant. Bourgne;
34. Saida, andriamiadana, lea. Phénotypes de résistance des souches d'escherichia coli responsables d'infections urinaires au centre hospitalo-universitaire de befelatanama antanarivo. The pan african medical journal mars 2017. 2016 2014;
35. Lassina Gadi Timbine. Etude des marqueurs moléculaires de la résistance aux antibiotiques des bactéries entériques isolées en afrique de l'ouest (burkina faso, mali, sénégal). Cheick anta diop de dakar; 2014.

36. Nzengang kamga gonsu, toukan m. Phénotypes de résistance des souches d'escherichia coli responsables des infections urinaires communautaires dans la ville de yaoundé (cameroun). 3 (2014):4.
37. Oualoquem Julien. Sensibilité et evolution de la résistance de escherichia coli aux antibiotiques de 2004 a 2008. Faculté de pharmacie;
38. Evolution de la sensibilité d'escherichia coli aux antibiotiques dans un etablissement de santé gériatrique. Dans: le pharmacien hospitalier et clinicien. 2011. P. 315-6. (elsevier; vol. 49).
39. Ndir a. Epidémiologie et impact médico-economique des inctions hospitalières causées par les entérobactéries productrices de betalactamases a spectre etendu au sénégal. Pierre et marie curie; 2012.
40. Nouria L. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de betalactamases a spectre etendu (blse) isolées de l'hopital de laghouat. Abou Bekr Belkaid; 2012.

Annexes

Annexe 1

MODE OPERATOIRE DU PRELEVEMENT CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

Principe

C'est une étape essentielle qui conditionne pour une grande part la qualité de l'examen et l'interprétation des résultats. Le recueil et le transport des urines doivent être effectués dans des conditions rigoureuses qui ont pour but d'éviter les contaminations d'origine urétrale, périnéale ou vaginale.

Matériel

- Pot stérile
- Poche stérile ou urinocol
- Seringue
- Aiguille
- Alcool
- Savon

Condition de prélèvement

- Le prélèvement est fait avant tout traitement antibiotique
- Si possible le matin au réveil lors de la 1^{ère} miction
- Sinon le recueil peut être fait à tout moment 3 heures après la dernière miction
- Aucun délai chez le porteur de sonde vésicale à demeure
- Le recueil et le transport doivent être effectués selon des règles bien précises pour éviter d'une part les contaminations périnéales et vaginales ; et d'autre part la multiplication très rapide à température ambiante des germes pouvant s'y trouver.

Technique

- **Prélèvement effectué chez le patient normal**
 - Une information détaillée orale sera donnée au patient à l'accueil du laboratoire lors de chaque prélèvement ;
 - Les urines doivent toujours être recueillies dans un flacon stérile fourni par le laboratoire portant une étiquette sur laquelle figure le numéro d'identification du patient;
 - Effectuer le recueil de préférence au laboratoire, si ce n'est pas le cas, amener les urines au laboratoire dans les 30 minutes qui suivent le recueil ou, à défaut conserver les urines au réfrigérateur pendant 4 heures au maximum ;
 - Le prélèvement doit être effectué après lavage des mains avec une solution hydro- alcoolique et, une toilette locale à l'aide d'un antiseptique (type Dakin) ou savon doux. La toilette locale doit être effectuée au niveau de la région : vulvaire chez la femme et du méat chez l'homme, suivi d'un rinçage à l'eau

- Eliminer le premier jet d'urine dans les toilettes ;
- Recueillir à la volée 20 à 30ml d'urine dans le flacon stérile au milieu du jet ;
- Eliminer dans les toilettes la fin du jet ;
- Refermer immédiatement le flacon puis le déposer dans un charriot se situant devant la toilette.

Cas particuliers

➤ **Chez le nourrisson**

- Il s'effectue dans la mesure du possible sur les urines du matin ;
- Le recueil des urines dans la journée doit s'effectuer si possible loin d'une miction
- Se laver soigneusement les mains ;
- Allonger l'enfant sur le dos ;
- Faire une toilette préalable du méat urinaire et des organes génitaux externes à l'aide de l'eau et au savon ;
- Rincer et bien sécher ;
- Retirer le revêtement adhésif de la poche collecteur d'urines pédiatrique ;
- Bien appliquer la poche en veillant à ce que l'extrémité soit obturée ;
- Ne pas laisser la poche plus d'une heure (sinon en mettre une autre) ;
- Oter la poche délicatement en soulevant un coin dès que l'enfant a uriné ;
- Tenir la poche verticalement, enrouler l'extrémité et coller avec de l'adhésif ;
- Poser la poche dans un flacon stérile, acheminer rapidement au laboratoire.

➤ **Chez le patient sondé**

- Clamper la tubulure avant le prélèvement ;
- Réaliser une hygiène des mains avec un produit hydro-alcoolique ;
- Mettre des gants à usage unique ;
- Vérifier la quantité d'urine présente dans la tubulure ;
- Désinfecter le site du prélèvement de la sonde à l'aide de coton stérile imbibé d'antiseptique alcoolique ;
- Percuter le site avec l'aiguille et insérer la seringue (selon la nature du site) ;
- Aspirer à l'aide de la seringue 20ml d'urine ou jusqu'à remplissage et transvaser le contenu de la seringue dans le flacon stérile fourni par le laboratoire ;
- Identifier le prélèvement à l'aide de l'étiquette patient.

Transport et conservation des échantillons

- Les urines sont préférentiellement recueillies au laboratoire.
- Si le prélèvement est fait en dehors du laboratoire, il doit être acheminé au laboratoire dans les plus brefs délais (au maximum 30 mn), ou à défaut conservé à +4°C pendant 4 heures au maximum, afin d'éviter la multiplication bactérienne.

Annexe 2

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN CYTOBACTERIOLOGIQUE DES URINES

Principe

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

Matériel

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

Consommables

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

Milieu de culture

- Gélose **URI SELECT4**

Etape pré analytique

Nature du prélèvement

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

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

Analytique

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

Examen macroscopique

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

Aspect : limpide, légèrement trouble, trouble, hémorragique,

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

Mise en culture

Ensemencer systématiquement pour éviter toute contamination des urines :

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

L'examen microscopique

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

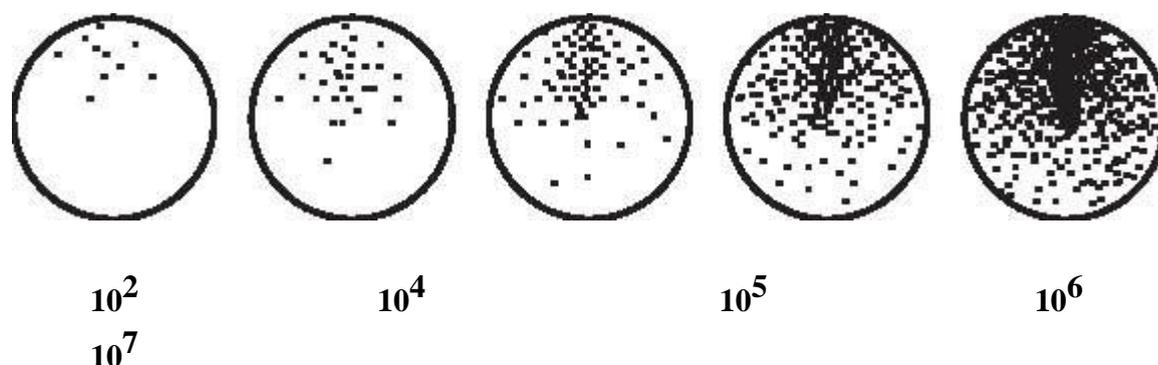
- Préparation du culot urinaire
 - o Homogénéiser l'urine ;
 - o Remplir les 3/4 d'un tube conique à centrifuger ;
 - o Centrifuger 5 minutes à 35 00 tours/minute ;
 - o Rejeter le surnageant dans le lavabo, en retournant le tube conique ;
 - o Remettre en suspension le culot en aspirant et refoulant doucement trois fois avec une pipette ;
 - o Etaler le culot sur une lame portant le numéro d'identification du patient pour la coloration de Gram **Cf. Mode opératoire de la coloration de Gram.**
 - o En suivant les règles d'utilisation du microscope, observer le frottis à l'immersion (objectif ×100).
- Dosages de protéines et du glucose
Elle consiste à la recherche de la présence de protéine et de glucose dans les urines à l'aide d'une bandelette adaptée
- Ne pas toucher les zones réactives de la bandelette,
- La plonger dans l'urine et la retirer immédiatement en éliminant l'excès d'urine en tapotant légèrement la tranche de la bandelette sur le bord du récipient.
- La tenir horizontale pour éviter toute interférence avec les réactifs des plages voisines.
- Lire à l'œil par comparaison à l'échelle colorimétrique.
- Si la lecture de la bandelette se révèle positive pour la recherche de protéine ou/et de glucose, prendre un tube conique et transvaser une partie des urines du flacon à centrifuger à 3500 tours pendant 5 minutes.
- Prendre un tube sec (tube à hémolyse) sur lequel on inscrira le numéro d'identification du patient, et y recueillir le surnageant qu'on enverra sur la paillasse de biochimie pour le dosage des protéines et/ou glucose.

N.B : Si l'urine est hémorragique il n'est pas nécessaire de faire l'étude chimique. Faire une recherche des cristaux et des parasites (schistosome) à partir du culot urinaire entre lame et lamelle.

Lecture et interprétation

- Numération

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



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

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

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

- Identification

Etablir le diagnostic en fonction de la couleur des colonies :

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

Un faible pourcentage de souches d'autres bactéries possèdent une activité β galactosidase et peuvent apparaître de couleur rose sur ce milieu : il s'agit de souches rarement isolées au cours des infections urinaires (*Salmonella*, *Shigella*, *Streptocoque A*) ou de souches pouvant être rencontrées dans ce type d'infections mais étant indole négative (*Citrobacter*, *Hafnia*, staphylocoques, *Streptocoque B*).

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

Coloration incolore

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

- o Si l'oxydase est **positive**, il y a forte présomption de bactéries non fermentaires (*Pseudomonas*, *Bulkholderia...*) ;
- o Si l'oxydase est **négative**, cas des bactéries fermentaires(Entérobactéries).

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

Cocci à Gram positif : faire la catalase et la coagulase Cf. **Mode opératoire du test de la coagulase**

Réf. M07 ANA BAC- 023 V1

Coloration bleue : réaliser un examen microscopique :

Bacille à Gram négatif : il y a forte présomption de bactérie appartenant au groupe K.E.S.C (*Klebsiella –Enterobacter – Serratia- citrobacter*) ; faire une identification par l'automate Vitek 2

Compact ou Mini Api

Cocci à Gram positif: forte présomption d'Entérocoque

Coloration brune : Forte présomption d'une bactérie appartenant au groupe *Proteus-Providencia-Morganella*.

Dans tous les cas de colorations, on procèdera à une identification sur l'automate Vitek 2 Compact suivi d'un antibiogramme. Les identifications et les antibiogrammes s'accompagnent toujours d'une pureté sur un milieu de culture en fonction du germe.

Un antibiogramme est obligatoirement réalisé si le dénombrement signe une infection urinaire et lorsqu'on possède des colonies isolées des bactéries responsables (obtenues en 24h).

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

- Antibiogramme réalisé sur le Mini Api
Le Mini Api nous sert à l'antibiogramme des bactéries à oxydase positive telles que *Pseudomonas aeruginosa* et les *streptocoques du groupe B*.
- Pour *Pseudomonas aeruginosa* ou les *Streptocoques du groupe B*, prendre une carte de lecture de *Pseudomonas aeruginosa* ou streptocoque sur laquelle on notera le numéro d'identification du patient ;
- Prendre un flacon de solution de Na Cl à 0,85% ;
- Casser le bout du flacon ;
- A l'aide d'une oese prendre avec 2 à 3 colonies isolées sur la gélose ;
- Introduire l'oese dans le flacon contenant la solution de Na Cl à 0,85% ;
- Frotter la partie de l'oese sur laquelle les colonies ont été prélevées dans le flacon jusqu'à obtenir une suspension homogène ;
- Prendre 10 µl de cette suspension qu'on introduira dans une solution ATB Médium pour *Pseudomonas aeruginosa* ou 200 µl de cette suspension dans une solution ATB S Médium pour les *Streptocoques du groupe B* ;
- Distribuer successivement 135 µl de cette solution qu'on va introduire dans chaque puits de la galerie ;
- Fermer ensuite la galerie et la mettre dans un bocal qu'on laissera à incubation à 37° pendant 24h à l'étuve ;
- Le lendemain matin prendre la galerie et l'introduire dans l'automate Mini Api pour l'antibiogramme en suivant les différentes instructions de l'automate.

A la fin de l'identification et l'établissement de l'antibiogramme, on procède dans le cas où on observe des germes multi résistants au souchage des bactéries concernées :

- *Salmonelles*
- *Staphylococcus aureus* (Méthicyline, Vancomycine Résistants)
- *Klebsiella pneumoniae*
- *E. coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*... **Cf. Mode opératoire de la technique de souchothèque Réf. M07 ANA BAC- 025 V2**

Résultat

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

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

Validation technique/ Critères de repasse

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

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

Hygiène et sécurité

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

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

Post analytique

Validation biologique

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

Rendu des résultats

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

Gestion des déchets

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématiquement dans l'eau de javel à

12° chlorimétrie. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail.

Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG- 002 V

Archivage des données

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

Annexe 3

MODE OPERATOIRE DE LA RECHERCHE DE L'OXYDASE

But du test :

La recherche de l'oxydase permet :

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

Principe

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

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

Matériel

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

Condition de stockage

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

Nature de l'échantillon

L'échantillon est constitué d'une colonie isolée pour laquelle on veut détecter l'enzyme cytochrome

oxydase. Cette colonie doit être issue d'une culture de 18 à 24 heures sur milieux de culture gélosés solides.

Contrôle de qualité

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

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

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

Réalisation du test

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

Résultat

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

NB :

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

- Les genres faiblement producteurs d'oxydase comme les *Pasteurella*, peuvent donner des résultats négatifs.
- Des résultats faussement négatifs peuvent survenir en cas de cultures mixtes de *Pseudomonas* et *Neisseria*. Une substance inhibitrice est produite par *Pseudomonas spp.* interférant avec la production d'oxydase de *Neisseria spp.*

Gestion des déchets

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

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

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

Annexe 5

MODE OPERATOIRE DE LA TECHNIQUE DE COLORATION DE GRAM

Principe

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

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

Matériel

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

Consommable

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

Réactif

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

- L'huile d'immersion.

Nature du prélèvement

Frottis d'un produit pathologique bien séché sur une lame

Contrôle de qualité

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

Technique

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

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

Résultat

A la coloration de Gram :

- Bactéries Gram négatif : coloration rose
- Bactéries Gram positif : coloration violette
- Levures : forme ovale coloration violet

Annexe 6

MODE OPERATOIRE D'UTILISATION DU VITEK2 COMPACT

Principe

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

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

Mode opératoire

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

N.B : Pour un germe, deux tubes secs seront utilisés dont l'un servira à l'identification et l'autre à l'antibiogramme ;

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

NB : différentes cartes utilisables :

- Streptocoques et entérocoques : ID : GP 67, réf 22226 ; ATB : AST-P 586, réf 22276
- Staphylocoques: ID GP: réf 21342. ATB : AST-P 580, réf 2223

- ID GN : réf 21341 ; ATB : non entérobactéries : AST- 222, réf 413083 ; entérobactéries : AST-N 233, réf 413117
- Levures : ID : YST, réf 21343 ; ATB : AST-YS01, réf 22108
- Au niveau de l'ordinateur de l'automate, à l'apparition de la page principale ;
 - . Cliquer sur Vitek 2
 - . Mettre Identifiant : **labsuper**, le mot de passe : **labsuper**
 - . 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'isolat ;
 - . 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.

Exemple : les bêtalactamases des entérobactéries (*Klebsiella*, *E. coli*), *S.aureus* résistant à méthicyline et vancomycine, *Pseudomonas* résistant à l'imipenème...et les phénotypes des souches sauvages (le germe sensible à tous les antibiotiques testés excepté les sensibilités naturelles).

Gestion des déchets

- **Retrait des cartes éjectées :**

Pour éjecter une carte, le Vitek 2 Compact la retire du carrousel/incubateur, la présente au lecteur de cartes et la dépose dans le récipient collecteur de déchets. Le réceptacle collecteur de déchet peut

contenir jusqu'à 60 cartes, il est recommandé de contrôler régulièrement le niveau du réceptacle collecteur de déchet et le vider

- Retrait du réceptacle collecteur de déchet :

- . Ouvrir le capot du récipient collecteur de déchets. Noter que les cartes usagées sont stockées à l'intérieur du réceptacle ;
- . Retirer le réceptacle collecteur de déchet de la station de travail en tirant sur le bord avant, vers soi ;
- . Jeter les cartes usagées dans la poubelle de déchets contaminés ;
- . Remettre en place le réceptacle collecteur de déchets en le faisant glisser vers l'intérieur ;
- . Fermer le capot du récipient collecteur de déchets.

Le Vitek 2 Compact réinitialise le compteur de déchets si le réceptacle est entièrement vidé.

Annexe 8

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DES PUS ET ABCES

Principe

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

Matériel

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

Consommables

- Gants,
- Embouts,
- Lames et lamelles,

- Tubes à hémolyse,
- Oeses,
- Cartes VITEK 2 Compact,
- Disques pour antibiogramme,
- Sachets anaérobies.

Réactifs

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

Etape pré analytique

Nature du prélèvement

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

Localisation

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

| | | | | |
|---------|----------------|---------------|-----------|-----------|
| cutané | oreille droite | narine droite | plaie | cathéter |
| | oreille gauche | | | |
| squames | œil droit | lingual | péri anal | sécrétion |
| ongle | œil gauche | gingival | gland | |
| nasal | buccal | gorge | pus | |

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

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

Etape analytique

Protocole de l'analyse

Préparation de la suspension

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

Examen direct

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

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

Culture

- Les différents milieux de culture sont ensemencés en fonction du Gram lu :
 - . Gélose au sang (COS), incubée à 37°C sous CO₂,
 - . Gélose chocolat, incubée à 37°C sous CO₂,
 - . Gélose au sang, incubée à 37°C en anaérobiose,
 - . Drygalski, incubé en aérobiose (si bacilles au Gram négatif),
 - . Chapman, incubé en aérobiose,
 - . Sabouraud, incubé en aérobiose (en fonction du prélèvement),
 - . CAN 2, incubé en aérobiose,
 - . Mueller Hinton, incubé en aérobiose,
 - . Bouillon cœur-cerveille.
- Porter le tout à l'étuve pendant 24 heures.

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

Lecture et interprétation

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

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

- Lactose positive, faire l'identification et l'antibiogramme

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

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

Interprétation des antibiogrammes

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

Validation technique/ Critères de repasse

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

Hygiène et sécurité

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

- Se laver les mains régulièrement à l'eau de javel et au savon anti-bactéricide.

Etape post analytique

Validation biologique

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

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

Rendu des résultats

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

Gestion des déchets

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

Archivage des données

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

Annexe 9

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

But

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

Principe

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

- Dans un tube stérile (tube sec) en vue de l'étude bactériologique,
- Dans un tube avec un anticoagulant (tube hépariné) en vue de l'examen cyto-chimique

Le prélèvement doit parvenir au laboratoire accompagné de renseignements cliniques et du contact du médecin traitant.

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

Matériel

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

Consommable

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

Réactif

- Colorant de GRAM ;
- Bouillon (cœur-cervelle) ;
- Milieux de culture (gélose au sang frais COS et au sang cuit Chocolat) ;
- Cartes Viteck 2 Compact ou galerie classique Mini Api.

Etape pré- analytique

Enregistrement

Informatique CODAT : code LIQ

Prélèvement

Tube hépariné préférentiellement ou tube sec.

Etape analytique

Examen bactériologique

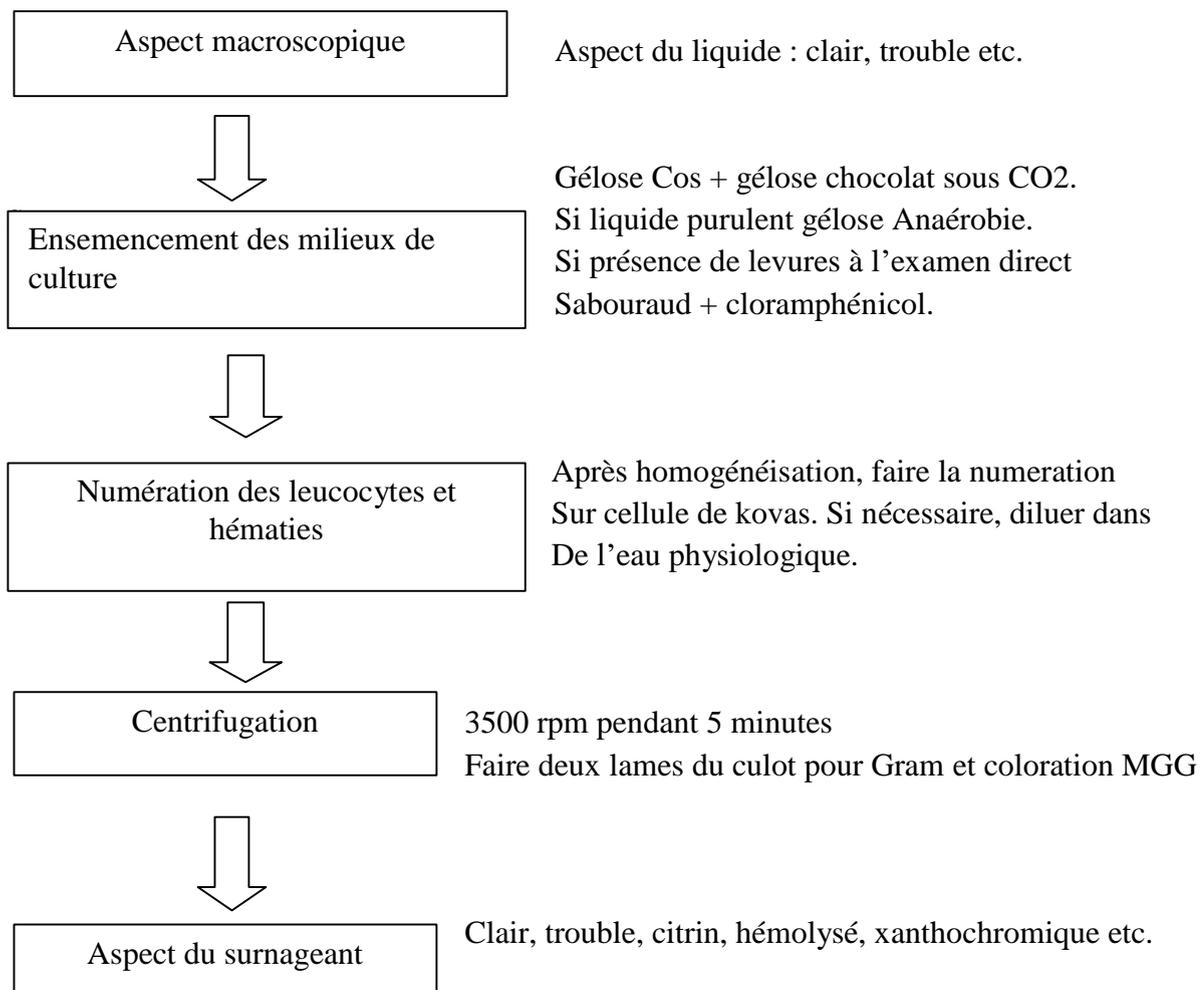
L'analyse bactériologique est toujours faite immédiatement.

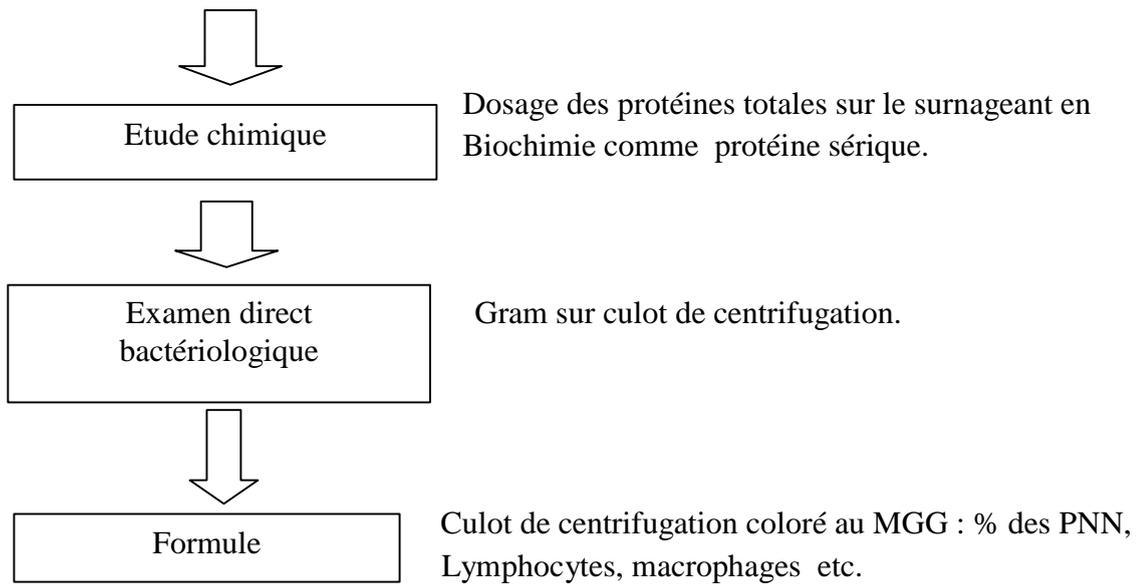
L'examen cytologique s'effectue de préférence sur le tube hépariné.

Noter sur la fiche de paillasse des liquides de ponction :

- Identification du laboratoire,

□ La nature de la ponction.





Incubation

L'incubation s'effectue à 37°C sous CO₂ dans une jarre pour les géloses chocolat et sang frais et en sachet anaérobie une gélose au sang frais pour le cas d'un liquide purulent. Le tout porté à l'étuve.

Lecture

La lecture des milieux est réalisée au bout de 24h puis 48h.

On procède à l'identification de toutes les bactéries. Les germes contenus dans le liquide d'ascite cirrhotique sont les entérobactéries et tout particulièrement *Escherichia coli*, mais aussi *Staphylococcus aureus* et plus rarement *Haemophilus parainfluenzae*, *Moraxella spp*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas spp*, etc.

Dans le cas de la tuberculose, la recherche de *Mycobacterium tuberculosis* dans l'épanchement est plus efficace.

Antibiogramme

On réalise un antibiogramme sur les germes suspects isolés en commun accord avec le Biologiste ou ses Assistants.

N.B : Identification + antibiogramme confère mode d'utilisation du Viteck 2 Compact ou du mini Api.

Hygiène et sécurité

- Ne jamais manipuler les échantillons à main nue et en absence de flamme ;
- Porter des gants à usage unique lors des manipulations ;
- Ne pas pipeter à la bouche ;
- Eviter les éclaboussures d'échantillons ou de solution les contenant ;
- Les surfaces souillées seront nettoyées par de l'eau de javel diluée à 10% ;
- Ne pas utiliser de réactifs après la date d'expiration : cas du Viteck ou Mini API
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents ;
- Utiliser un cône de distribution neuf pour chaque échantillon

Validation technique/ Critères de repasse

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

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

Résultat

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

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

Etape post analytique

Validation biologique

Effectuer par le biologiste, consistant à interpréter les résultats du test en tenant compte du contexte

clinique et éventuellement des résultats d'autres examens.

Rendu des résultats

Les résultats sont rendus manuellement par le technicien responsable de l'examen sur le système

CODAT.

Gestion des déchets

Pendant la manipulation tous les objets souillés sont plongés systématique dans l'eau de javel à 12°

chlorimétrique. Les objets tranchants sont jetés dans une boîte de sécurité et les objets souillés non tranchants dans la poubelle jaune (poubelle contaminée). Tous les déchets seront éliminés après le travail. **Cf. Procédure de tri et élimination des déchets biomédicaux Réf. P10 HYG-002 V1**

Archivage

L'enregistrement, les cahiers de paillasse et les registres de laboratoire (serveur électronique) sont

conservés au laboratoire.

Annexe 10

MODE OPERATOIRE DE L'EXAMEN DES HEMOCULTURES

Principe

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

Matériel

- Microscope,
- Bec benzène,

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

Consommable

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

Réactif

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

Pré analytique

Condition du prélèvement

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

Matériels

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

Il est important de noter qu'il existe des critères d'inclusion des patients à l'hémoculture. Au centre

de développement pour les vaccins du centre hospitalier universitaire Gabriel Touré se sont:

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

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

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

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

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

Analytique

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

Introduction des flacons dans le BacT/ALERT 3D.

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

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

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

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

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

Pour sortir le flacon positif du BacT/ALERT 3D

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

Pour sortir le flacon négatif du BacT/ALERT 3D

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

Traitement des flacons

- Les flacons sortis négatif* ne feront pas l'objet d'étude et le résultat sera saisi « stérile » tout en mentionnant la date de sortie.
- Les flacons sortis positif*
- Désinfecter la partie caoutchouc du flacon avec de l'alcool iodé
- Mélanger voir vortexer le flacon
- Piquer le bouchon à l'aide d'une aiguille associée à une seringue de 10 ml

- Si le bouchon du flacon (en particulier pour le flacon anaérobie) est bombé, évoquant la présence de gaz dans le flacon, retirer le piston, laisser le gaz s'échapper via l'aiguille, puis passer à l'ensemencement.

- Examen direct et mise en culture*

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

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

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

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

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

Lecture et interprétation

- Bacille à GRAM négatif type entérobactérie oxydase négative, identification galerie API 20 E ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme,

- Bacille à GRAM négatif type non entérobactérie oxydase positive, identification galerie API

20 NE ou carte Vitek GN suivi de l'antibiogramme **Cf. Mode opératoire du test de l'oxydase Réf. M07 ANA BAC- 009 V2**

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

- Cocci à GRAM positif type Staphylocoque :

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

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

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

Interprétation des antibiogrammes

- Lorsqu'elle est réalisée à partir de disques sur milieu M.H ou sur milieu COS, l'interprétation se fera par mesure des différentes CMI tout en se référant sur la fiche des diverses CMI prévues pour la circonstance.
- Lorsqu'elle est faite par le biais des galeries ATB sur mini API, une relecture à l'œil nu est préconisée après celle de l'appareil afin d'être sûr sur la sensibilité – intermédiaire – résistance donné par l'appareil.
- Si cas d'une **Bêta lactamine à spectre élargie** faire la recherche de BLSE sur milieu MH avec les antibiotiques suivants : AMC au centre, CTX de côté et CZ de côté également permettant d'obtenir un bouchon de champagne.

- Réalisé sur le VITEK 2 COMPACT une éventuelle interprétation devient difficile en ce sens que tout se passe dans la machine et que les cartes ne sont pas faciles à interpréter. L'essentiel est de ne pas confondre le GRAM (positif et négatif).

Validation technique / Critères de repasse

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

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

Résultat

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

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

Hygiène et sécurité

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

Post analytique

Validation Biologique

Réservé au biologiste ou ses assistants.

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

Elle est objectivée par la signature du compte-rendu.

Hygiène et sécurité

Lors des manipulations, il faut toujours :

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

Gestion des déchets

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

Archivage

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

FICHE SIGNALETIQUE

Nom : Dembélé

Prénom : Aminata

Nationalité : Malienne

Section : Pharmacie

Titre de la thèse : Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches d'*Escherichia coli* isolées au laboratoire Rodolphe Mérieux de 2016 à 2017 à Bamako/Mali

Ville de soutenance : Bamako/Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la faculté de Pharmacie

E-Mail : amidem22@gmail.com

Téléphone : 00223 71 40 36 10

Secteur d'intérêt : Bactériologie, Virologie, Maladies infectieuses, Santé publique, Epidémiologie

Année : 2017-2018

Résumé

La présente étude avait pour objectifs de mettre en place un système de surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches d'*Escherichia coli* isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux. C'était une étude rétrospective sur deux ans allant de janvier 2016 à septembre 2017.

Différents milieux ont été utilisés pour la culture des souches d'*Escherichia coli* notamment Uiselect4 qui est un milieu chromogène sur lequel les colonies d'*E. coli* apparaissent rose après 24h d'incubation à 37°C. La gélose Drigalski aussi est un milieu sélectif pour les bacilles Gram négatif où par fermentation du lactose les colonies d'*E. coli* apparaissent jaunes après 24h d'incubation à 37°C pour l'identification. Le test de sensibilité aux antibiotiques par la méthode de diffusion en milieu gélosé de Muller Hinton selon la recommandation du CA-SFM version 2017 ou par le Vitek2 Compact. Et la souche *E coli* ATCC 25922 a été utilisée pour le contrôle de qualité interne.

Durant la période d'étude 402 bacilles à gram négatif ont été identifiés à partir de différents produits pathologiques (Hémoculture, Liquide d'ascite, prélèvements urinaire, urétral, pus) parmi lesquelles les entérobactéries représentaient 92% de l'effectif et *Escherichia coli* était le germe le plus isolé (49%). Le pourcentage d'isolement de l'espèce à partir des prélèvements urinaires était plus important soit 62,5%. Dix-huit pour cent (18%) des souches étaient productrices de bêta-lactamases à spectre élargie (BLSE), le phénotype CASE était le moins rencontré (1%). La résistance aux antibiotiques a été observée à plusieurs niveaux de familles d'antibiotiques notamment les bêta-lactamines, les aminosides et les quinolones. L'imipénème, la fosfomycine et la nitrofurantoïne étaient les molécules les plus actives. Les souches isolées des urines étaient fortement productrices de BLSE (58,33%).

Les souches isolées dans les échantillons des patients en provenance des structures de santé communautaires produisaient plus de BLSE et de phénotypes sauvages soit 38,89% et 70,83% respectivement.

L'augmentation de la résistance aux antibiotiques a considérablement augmenté ce qui rend la prise en charge des infections à *Escherichia coli* difficile.

Mots clé : Résistance, Antibiotiques, *Escherichia coli*, CICM, Mali.

MATERIAL SAFETY DATA SHEET

Name : Dembélé

First name : Aminata

Nationality : Malian

Section : Pharmacy

Title of the thesis : Surveillance of the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated in the Rodolphe Mérieux laboratory from 2016 to 2017 in Bamako / Mali

City of defense : Bamako / Mali

Place of deposit : Library of the Faculty of Pharmacy

E-Mail : amidem22@gmail.com

Phone : 71 40 36 10

Focus Area : Bacteriology, Virology, Infectious Diseases, Public Health, Epidemiology

Year : 2017-2018

Abstract

The objective of this study was to highlight an antimicrobial resistance surveillance system for *Escherichia coli* strains isolated at the Rodolphe Mérieux Laboratory. It was a two-year retrospective study from January 2016 to September 2017.

Different media have been used for the culture of *Escherichia coli* strains including Uiselect4 which is a chromogenic medium on which colonies of *E. coli* appear pink after 24h incubation at 37 ° C and Drigalski medium agar selective for Gram-negative bacilli which by lactose fermentation colonies *E. coli* appear yellow after 24h incubation at 37 ° C. An antibiogram was performed on the identified and isolated colonies.

During the study period 402 gram-negative bacilli were identified from different pathological products (blood culture, ascites fluid, urinary tract, urethral, pus) among which Enterobacteriaceae accounted for 92% of the population and *Escherichia coli* was the most isolated germ 49%. The percentage of isolation of the species from urinary samples was higher, ie (62.5%). Eighteen percent (18%) of the strains were beta-lactamase producing, the CASE phenotype was least met (1%).

Antibiotic resistance has been observed at several levels of antibiotic families including beta-lactams, aminoglycosides and quinolones.

Imipenem, fosfomycin and nitrofurantoin were the most active molecules.

Strains isolated from urine were highly beta lactamase producing (58.33%).

Isolated strains in patient samples from community-based health facilities accounted for more ESBL and wild-type phenotypes at 38.89% and 70.83%.

The increase in antibiotic resistance has increased considerably, making the management of *Escherichia coli* infections difficult.

Key words : Resistance, Antibiotics, *Escherichia coli*, CICM, 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 des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque. »

Je le jure