1. Objectif de l'étude

Notre étude pratique à été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie appliqué de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie (université de Tébessa).Le prélèvement des malades cible de notre étude a été réalisé au niveau de la wilaya de Tébessa (Est Algérie).

Vingt cinq patients des deux sexes ont été prélevés dans une période de trois mois (début février jusqu'au fin avril), nos objectifs étaient de :

- Visualiser et déterminer la fréquence de l'étiologie bactérienne responsable de l'infection du pied diabétique par isolement et identification biochimique des microorganismes responsables.
- Apprécier l'évolution de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries par une étude de la sensibilité aux antibiotiques.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Phase de prélèvement

2.1.1. Matériel

a) Matériel biologique

Le matériel biologique est représenté par le pied des malades admis pour hospitalisation au service de médecine interne Bouguera Boulaaras) à Békaria wilaya de Tébessa. Le choix des malades a été effectué selon des critères de choix, qui sont les suivants :

- ✓ Malades admis et diagnostiqués cliniquement (pied diabétique).
- ✓ Présence d'un état de diabète (ID, NID).
- ✓ deux sexes masculin et féminin.
- ✓ Tout âge confondu.
- ✓ diffèrent aspect et stade de l'infection du pied sont inclus.
- ✓ Malades soumis ou non à une antibiothérapie.

Tableau 2. Récapitulatif des malades choisis et de l'ensemble des caractéristiques correspondantes **(P : patient)**

patients	**sexe**	**Age**	**diabète Type**	**Type d'infection**	**Localisation**	**déformation**	**Traitement diabétique**
P 1	F	53	I	Récidive	Moyennement profond	Orteils en griffe	insuline
P 2	H	51	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 3	H	46	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 4	H	49	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 5	H	54	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 6	H	49	II	Récidive	Moyennement profond	/	orale
P 7	H	47	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 8	H	34	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 9	H	44	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 10	H	50	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 11	H	47	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 12	H	49	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline

Tableau 2. (Suite)

patients	sexe	Age	diabète Type	Type d'infection	Localisation	déformation	Traitement diabétique
P 13	H	46	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 14	H	52	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 15	H	45	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 16	H	51	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 17	H	39	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 18	H	43	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 19	H	52	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 20	H	49	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 21	F	51	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 22	H	47	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 23	F	50	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline
P 24	H	43	I	Primo-Infection	Superficielle	/	insuline
P 25	H	46	I	Récidive	Moyennement profond	/	insuline

b) Matériel de prélèvement

Des écouvillons stériles fermés hermétiquement ont été utilisés pour assurée un bon prélèvement, l'écouvillonnage permet la collecte des bactéries réellement responsables de l'infection. D'un autre coté des écouvillons stériles pré-remplies par un bouillon nutritif d'enrichissement ont été utilisés pour la mise en enrichissement immédiate des prélèvements réalisés avec les écouvillons stériles sec et assurer un transport adéquat des échantillons.

2.1.2. Méthodes

- ✓ **préparation de la plaie**

Avant le prélèvement, débridement de la plaie et nettoyage au sérum physiologique ou savon antiseptique pour éliminer la flore bactérienne colonisant, rincer, sécher avant de réaliser le prélèvement.

- ✓ **Technique de prélèvement**

Frotter la surface de la plaie avec un écouvillon stérile puis introduire ce dernier dans un tube contenant l'eau peptoné (3ml), en utilise 2 écouvillons (1 pour examen microscopique et l'autre pour la culture).

Les prélèvements sont ensuite acheminés rapidement au laboratoire de microbiologie.

2.2. Phase d'analyse microbiologique au niveau de laboratoire

Une fois les prélèvements sont aux niveaux de laboratoire, une série d'analyses bactériologique sont effectués :

2.2.1. Matériel

2.2.1. 1.Examen direct

a). Lames propre dégraissées

b). Colorants pour coloration des frottis :

- ✓ Bleu de méthylène (coloration au bleu de méthylène)
- ✓ Violet de gentiane, leguole, alcool, fushine (coloration de Gram).

2.2.1.2. Mise en culture

Ce sont des milieux ordinaires, enrichies et sélectifs pour isolement, pour l'identification spécifique ont été utilisés.

- **Gélose nutritive**, ce milieu permettant la culture des bactéries peu exigeantes**. (Annexe I)**
- **Gélose au sang**, c'est un milieu d'isolement enrichi sur lequel les Streptocoques se développent bien. Il permet, la lecture du caractère hémolytique. **(Annexe)**
- **Gélose Chapman**, ce milieu contient un inhibiteur : fortes concentrations en chlorure de sodium ($75\ g.L^{-1}$), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl, et la fermentation de mannitol. (**Annexe I)**
- **La gélose Hektoene**, est un milieu pour l'isolement des entérobactéries, deux indicateurs sont présents dans le milieu : le bleu de bromothymol (indicateur de pH), la fuschine acide (qui se colore en présence d'aldéhyde). **(Annexe I)**
- **La gélose de Sabouraud** constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. **(Annexe I)**
- **La gélose au cétrimide,** est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des Pseudomonas et notamment de *P.aeruginosa*. Ce milieu, proche du milieu King A, favorise aussi la production de pigments par *P.aeruginosa* **(Annexe I)**
- **Le milieu viande foie,** L'étude du type respiratoire d'une bactérie (c'est à dire ses rapports avec l'O_2) nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en dioxygène, mené à la recherche des anaérobies sulfito-réducteurs. **(Annexe I)**

2.2.1.3. Caractérisation biochimique des souches bactériennes

a) caractérisation préliminaire

- ✓ Disques oxydase
- ✓ Eau oxygénée pour détermination de la catalase

b) caractérisation détaillée

- **La galerie biochimique API 20 E,** système standardisé pour l'identification des entérobactéries, comportant 20 tests biochimique miniaturise, il comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydraté .les microtubes sont inoculé avec une suspension bactérienne.les réactions produits pendant la période d'incubation se traduisant par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide de tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

2.2.1.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques:

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode recommandée par EUCAST 2016 (European Comity on Antimicrobial Susceptibility Testing) de disque (la méthode de diffusion en gélose).

a)Écouvillons stériles

b) Disques d'antibiotiques

Un ensemble de disques d'antibiotiques ont été utilisés selon le genre bactérien isolé et suivant les recommandations EUCAST 2016, une liste de molécules d'antibiotiques a été appliquée sur les différentes catégories de bactéries isolées dans notre étude :

b.1) Antibiotiques testés sur les entérobactéries

- Penicillines: Amoxicilline Clavulanic Acid(AMC), Amoxicilline (AMX),
- céphalosporine: Cifotaxime(CTX), Céfoxitine(FOX),

- Fluoroquinolones : Acide nalidixique(NA), Pefloxacine (PEF), Ciproflaxine(CIP),
- Aminoglycosides; Kanamycine(K), Amikacin(AK), Tobramycine(TOB),
- Nitrofuranes ; Nitrofurantoin(F),
- Divers: Fosfomycine(FOS),

b.2) Antibiotiques testés sur les staphylocoques:

- Fluoroquinolones : Pefloxacine (PEF), Ciproflaxine(CIP),
- Aminoglycosides; Amikacine(AK), Tobramycine(TOB)
- Macrolides; Erythromycine(E), Clindamycine (DA)
- Miscellaneous agents; Acid fusidic(FC),
- Aminosides; Kanamycine(k)

b.3) Antibiotiques testés sur les Pseudomonas

- Penicillines: Ticarcillin(TC), Ticarcillin cluvalinic acid(TTC),
- Carbapenems: Imipenème(IMI)
- Aminoglycosides: : Gentamicine(GN),

c) Milieu Muller Hinton (MH)

Gélose **Mueller-Hinton**, permet de tester l'action des antibiotiques en disques sur les bactéries, il a des caractéristiques chimiques bien déterminées, dont l'épaisseur doit être de 4 mm (**Annexe).**

d) la suspension La méthode nécessite la préparation d'une suspension bactérienne 0.5 de la gamme de MacFarland.

2.2.2. Méthodes

2.2.2.1. Examen direct

- ✓ **Préparation du frottis:** la confection du frottis sur une lame neuve, en frottant l'écouvillon porteur de prélèvement, Pour réaliser un frottis mince. Ce dernier est Fixé par passage rapide à travers la flamme du bec bunsen sans trop le chauffer.

- ✓ **Coloration au bleu de Méthylène**

Coloration simple: Frottis fin est traité par un seul colorant basique pendant 2 à 3 minutes puis rincé pour étudier la réaction cellulaire et pour apprécier les bactéries, permet de distinguer à la fois la morphologie des bactéries et d'apprécier la qualité et la quantité de la réaction immunitaire cellulaire.

Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de distinguer à la fois la morphologie des bactéries (cocci ou bâtonnets) et de les classer en deux groupes celui des Gram positifs et des Gram négatifs. Celles qui retiennent le violet de Gentiane après l'action de l'alcool sont des Gram positives, Celles qui sont décolorées et prennent la couleur d'un second colorant sont dites Gram négatif **(annexe).**

2.2.2.2. Mise en culture

Consiste à ensemencer des milieux de culture à partir des écouvillons qui ont servi au prélèvement. On dépose l'inoculum, on réalise des stries à l'aide d'une pipette Pasteur. Ces milieux ont été incubés à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

2.2.2.3. Caractérisation biochimique des souches

2.2.2.3. 1.Tests préliminaires

a.1) Test catalase

- ➢ **Principe**

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène) en H_2O et O_2. Il empêche l'accumulation d'H_2O_2 qui est toxique pour la cellule bactérienne.

- **Technique**

La mise en évidence de la catalase consiste à déposé sur une lame propre et sèche, une goutte d'H_2O_2 à 10 volumes et ajouter une colonie prélevée directement avec une pipette pasteur en milieu gélose**,** la présence de catalase se manifeste par un dégagement immédiat des bulles gazeux.

b) Test oxydase

- **principe**

C'est un test fondamental pour orienter l'identification des bacilles à gram négative. Les oxydases sont des enzymes qui catalyse une réaction d'oxydoréduction impliquant une molécule de dioxygène(O_2) comme accepteur d'électron, la mise en évidence de l'enzyme est effectuée en utilisant des disques d'oxydase, elle consiste à déposer sur une lame un disque d'oxydase, et l'imbiber avec une goutte d'eau physiologique stérile. L'appariation d'une coloration violette brune, signifié que la bactérie est oxydase positive.

2.2.2.3.2. Caractérisation biochimique détaillée

Pour les entérobactéries, elle a été réalisée, selon des étapes comportant **:** Préparation de la galerie, préparation de l'inoculum et inoculation de la galerie (annexe I). La lecture des résultats à été faite à l'aide de logiciel API 20 E (Version 1,2003), et les présentations graphiques réaliser par Excel (Version 6, 2007).

2.2.2.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé selon la méthode recommandée par EUCAST 2016 (European Comity on Antimicrobial Susceptibility Testing) de disque (la méthode de diffusion en gélose). Les étapes comportent **La préparation de la suspension et ensemencement de 0.5** MCF, tremper l'écouvillon dans la suspension bactérienne et ensemencer les boites en stries attaché sur toute la surface de milieu, enfin on applique les disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller-Hinton en appuyant légèrement à l'aide d'une pince flambé à la flamme du bec-bunsen. Les boites sont ensuit porté à l'étuve à 37C° pendant 24 heures (**annexe I**).

Lecture et interprétation

La lecture et l'interprétation des isolats (sensible, résistant) a été faite selon les diamètres critique (EUCAST 2016). Permettra de détecté le phénotype sensible et résistant.

Tableau 3. Les valeurs critiques, pour l'interprétation des résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Staphylococcus* spp sur milieu gélosé **(EUCAST, 2016)**.

Antibiotiques	**Diamètre de la zone**	
	S≥	**R≤**
Pefloxacine	22	16
Ciproflaxcine	20	20
Erythromycine	21	18
Clindamycine	22	19
Amikacine	18	16
Kanamycine	17*	15*
Acid fusidic	24	24
Tobramycine	20*	20*

Tableau 4. Les valeurs critiques, pour l'interprétation des résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Entérobactéries* sur milieu gélosé **(EUCAST ,2016)**. (R : résistante, S : sensible)

Antibiotiques	**Diamètre de la zone**	
	S≥	**R≤**
Acide nalidixique	20*	15*
Pefloxacine	22*	19*
Fosfomycine	14*	14*
Ciproflaxine	22	19
Kanamycine	17*	15*
Amikacin	18	15
Céfoxitine	21	21
Nitrofurantoin	11	11
Tobramycine	17	14
Amoxicilline Clavulanic Acid	19	19
Cifotaxime	20	17
Amoxicilline	14	14

(*): Des valeurs critique tirées à partir de CA-SFM 2013.

Tableau 5. Les valeurs critiques, pour l'interprétation des résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des *Pseudomonas* sur milieu gélosé **(EUCAST ,2016).** (R : résistante, S : sensible).

Antibiotiques	**Diamètre de la zone**	
	S≥	**R≤**
Ticarcillin	**18**	**18**
Gentamicine	**15**	**15**
Imipenème	**20**	**17**
Ticarcillin- cluvalinic acid	**18**	**18**