

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de Fin d'étude en vue de l'obtention

Du diplôme de Master en :

Spécialité : Microbiologie-Bactériologie

Filière : Sciences Biologiques

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

**Titre : Multirésistance aux antibiotiques des souches
Acinetobacterbaumanni isolées au CHU Blida Unité Frantz-Fanon**

Présenté par

Mr DOUMBIA Ibrahim

Devant le Jury :

Mme AMMARE W.	Maitre assistante A	U. Blida1	Président
Mme AIT SAID N.	Maitre assistante A	U. Blida1	Examineur
Dr BENAMARA M.	Maitre assistante	U. Blida1	Promotrice

Année Universitaire 2015-2016

REMERCIEMENTS

Le chemin qui mène au succès est semé d'embûches. Il peut parfois être tortueux et sinueux. C'est pourquoi, une fois à destination, nous ne pouvons manquer de rendre hommage à celles et ceux qui ont contribué, d'une façon quelconque, à rendre le voyage un peu plus agréable.

Tout d'abord, je rends grâce au Tout Puissant, Dieu l'Omniscient, l'Omnipotent, l'Infiniment Sage, qui m'a guidé au cours de cet aventure dont l'épilogue est la présentation de ce mémoire de fin d'étude.

Je remercie ensuite ma famille pour le soutien indéfectible, les encouragements constants, la confiance immuable, les prières incessantes, autant de choses qui ont fait que ce travail a pu voir le jour.

Chers tontons et tante :Donush et Chahine, Daouda N'DOYE et Karim SAMAKE, soyez remerciés pour l'amour, le soutien, les encouragements et conseils précieux.

Je n'oublie pas les membres du personnel du laboratoire de bactériologie de l'Institut Nationale de Recherche en Santé Publique (INRSP) de Bamako, au Mali et tout particulièrement le Dr DIALLO qui, par ses idées lumineuses, m'a orienté vers les infections nosocomiales.

Je rends un vibrant hommage au Professeur BELOUNI, dont la gentillesse et la sympathie n'ont d'égales que sa grandeur d'âme, qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire au CHU Blida unité Frantz Fanon.

Je suis profondément reconnaissant à l'égard du Dr MAHFOUD et le Dr AZREAUD pour leur disponibilité, gentillesse et encouragements.

Elle est incontestablement la personne que je ne saurais remercier à sa juste valeur, car elle a été, pour ainsi dire, la lumière au bout du tunnel. A ma promotrice, le Docteur BENAMARA, je dis : Merci pour tout ! Je souhaite à votre futur bébé une longue vie dans l'amour et la protection de ses parents et de toute sa famille.

Mes sincères remerciements s'adressent au personnel du Laboratoire centrale du CHU Blida unité Frantz Fanon, particulièrement à ceux du labo de bactériologie, pour m'avoir accueilli dans votre équipe dynamique, compétente, studieuse, soudée et joyeuse. Je n'aurais espéré travailler avec meilleure équipe que vous.

Je remercie vivement tous mes Professeurs et membres de l'administration de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV) et du département de Biologie et Physiologie Cellulaire, pour mes années d'études passer avec vous.

Je n'oublie pas le Dr BELHOCINE et tous les membres du groupe BHK pour m'avoir inspiré.

Je remercie tous mes camarades de classe, ceux de la cité 3, les étudiants maliens à Blida et un peu partout en Algérie pour leur soutien, encouragement, conseils et leçons, camaraderie joyeuse et franche amitié.

Je termine en remerciant toutes celles et tous ceux qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à ce travail et à ma vie d'élèves et d'étudiants, car l'homme n'est Homme sans les Hommes.

DEDICACE

Je dédie ce travail à mon père, car un arbre n'est rien sans les racines,

A ma mère Salimata, paix à son âme et que la terre lui soit légère, pour m'avoir inspiré la voix que j'ai choisie,

A ma mère Francine, pour avoir été là pour mes frères et moi, pour nous avoir aimés, soutenus et encouragés, même sans qu'on le sache, pour avoir persévéré dans notre éducation et fait de nous les hommes que nous sommes aujourd'hui ; parce que je ne pourrais jamais vous remercier assez, je vous dédie ce mémoire,

A mes frères Ali, Tony et Bakary

A tous mes grands Parents,

A ma grand-mère Mariam que j'adore, et qui est un symbole et exemple à suivre pour moi,

A mes autres frères Toumani, Jahfar, Jean Pierre, Abdouramane (le mont), et tous ceux dont je n'ai pas cité le nom et qui sont présents dans mon cœur,

A Alima YANOGA qui m'a motivé dans les temps difficiles et dont la joie de vivre m'a donné courage à bien des reprises,

A la mémoire des défunts de la famille DOUMBIA et aux regrettées âmes d'ici et d'ailleurs, vous êtes toujours présents dans nos pensées.

RESUME

Acinetobacterbaumannii est un bacille gram négatif, pathogène opportuniste, dont le trait marquant est son émergence au cours de ces dernières années comme bactérie multi résistante à un nombre élevé d'antibiotiques. Cette bactérie a développé des mécanismes de résistance qui sont à l'origine de souches dites « pan-résistantes » aboutissant à des impasses thérapeutiques.

A. bamannii est un casse-tête pour les professionnels de santé ; il est très difficile à maîtriser dans un contexte épidémiologique.

La présence de cette bactérie dans un environnement hospitalier constitue un risque pour la vie des patients.

Ce travail réalisé au niveau du laboratoire central du CHU Blida a porté sur l'étude de la résistance aux antibiotiques des souches *Acinetobacterbaumannii*.

Nous avons évalué la résistance de ce pathogène pendant la période de 2013 à 2015 ; nous avons ressorti les résultats de façon à déterminer les services hospitaliers desquels nous isolons les souches et les prélèvements dont sont issues les isolats. Ainsi nous avons déterminé le service et le prélèvement qui observent le taux le plus significatif de souches *Acinetobacterbaumannii* isolées.

Nous avons étudié les possibilités de traitement des souches pan-résistantes et ceci en évaluant la sensibilité des souches résistantes à l'ensemble des antibiotiques testés à la colistine ; et enfin nous avons présenté les perspectives et les voies possibles de maîtrise de ce pathogène.

Au cours de l'étude il a été enregistré un pourcentage de 85,80 %, 78,08 %, 57,20% de résistance respectivement à la ceftazidime, la ciprofloxacine, l'imipénème et 33.09 % de souches productrice BLSE. Ce qui représente un taux important et inquiétant de BMR. La sensibilité de la bactérie face à la colistine, fait de cet antibiotique l'un des derniers recours thérapeutiques possibles contre les souches résistantes à toutes les molécules testées. Cependant la consommation abusive de cette molécule pourrait changer la situation défavorablement.

Mots clés : *Acinetobacterbaumannii*, bactérie multi-résistante, bactérie pan-résistant, infection nosocomiale, antibiotiques.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a gram-negative bacillus, opportunistic pathogen, whose striking feature is its emergence in recent years as bacteria multi-resistant to a large number of antibiotics. This bacterium has developed resistance mechanisms that are causing strains called "pan-resistant" leading to therapeutic impasses.

A. baumannii is a headache for health professionals, it is very difficult to master in an epidemiological context.

The presence of this bacteria in a hospital environment poses a risk to the lives of patients.

The work done at the central laboratory of the University Hospital of Blida focused on the study of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* strains.

We evaluated the resistance of this pathogen in the period from 2013 to 2015, we exited the results to determine the hospital services and samples, from which we isolate strains. Thus we determine the service and the sample observing the most significant rate of isolated *Acinetobacter baumannii* strains.

We studied the possibilities of treating pan-resistant strains, and this by evaluating the sensitivity of strains resistant to all antibiotics tested colistin; and finally we have presented the prospects and possible ways of mastering this pathogen.

We recorded a percentage of 85.80%, 78.08%, 57.20% resistance to ceftazidime, ciprofloxacin, imipenem respectively and 33.09% of ESBL producing strains. This represents a significant and disturbing levels of BMR. The sensitivity of the bacteria faces to colistin, make this antibiotic one of the last possible therapeutic use against strains resistant to all tested molecules. However, the abuse of this molecule could change the situation unfavorably.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, multidrug-resistant bacterium, pan-resistant bacteria, nosocomial infection, antibiotics.

ملخص

راكدة بومانية هو عصيات سلبية الغرام، الممرضات الانتهازية، الذب هو ظهور لها في السنوات الأخيرة، حيث البكتيريا المتعددة المقاومة للعدوكبير تؤدي إلى العلاجية "عمومقاومة" هذه البكتيريا لتطوير آليات المقاومة التي تسبب عاسلات. من المضادات الحيوية مميزة مقلقة للنظر.

صدا عالمهيننا الصحيين، فإنهمنا الصعبد الدرجة الماجستير فيسيقاالروباي *A. bamannii*.

وجود هذا البكتيريا في بيئية المستشفى يشكل خطر اعلحياة المرضى.

الراكدة *baumannii* ركز العمل المنجز في المختبر المركز بلالبلية مستشفى جامعة علندر اسةمقاومة المضادات الحيوية في سلاات.

قمنا بتقييم مقاومة هذا الممرض في الفترة 2013-2015. خرجنا النتائج لتحديد الخدمات المستشفى الذين عزل سلاات الو العينات التي من عزلات. الراكدة معزولة. درسنا إمكانات علاج سلاات مقاومة للعموم، *baumannii* وبالتالي نحن مصمونا الخدمة وإزالة المراقبة معدلاهم سلاات. وذلك عن طريق تقييم حساسية سلاات مقاومة لجميع المضادات الحيوية اختبار كوليستين. وأخير اقدمنا احتمالات السبل الممكنة لاتقان هذا العامل للمرض.

سجلنا نسبة 85.80%، 78.08%، 57.20% مقاومة السيفناز يدي على التوالي، سيبر وفلو كاساسين، إيميبينيمو 33.09%. حساسية البكتيريا الوجه كوليستين، BMR السلاات المنتجة. وهذا يمثل مستويات كبيرة ومقلقة من ESBL من جعل هذه المضادات الحيوية واحدة من آخر استخدام العلاجي محتمل ضد سلاات مقاومة لجميع الجزينات التي تم اختبارها. ومع ذلك، يمكن إساءة استخدام هذا الجزية يتغير الوضع بالسلب.

راكدة بومانية، البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة، والبكتيريا المقاومة للعموم، عدو بالمستشفيات، والمضادات الحيوية: كلمات البحث.

TABLE DES MATIERES

Introduction	15
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
CHAPITRE I: ACINETOBACTER BAUMANNII HABITAT ET CARACTERES BACTERIOLOGIQUES	18
1. Habitat	18
2. Caractères bactériologiques	18
2.1. Taxonomie :	18
2.2. Caractères morphologiques	19
2.3. Caractères cultureux	21
2.4. Caractères biochimiques	23
CHAPITRE II : POUVOIR PATHOGENE DE L'ACINETOBACTER BAUMANNII ..	25
1. Pouvoir pathogène de l'Acinetobacter baumannii	25
2. Facteurs de pathogénicité de l'Acinetobacter baumannii	25
2.1. Facteurs de virulence	25
2.2. Constitution de biofilm	26
2.2.1. Définition du biofilm	26
2.2.2. Etapes de la constitution du biofilm	27
2.2.3. Propriétés du biofilm	28
2.2.4. Acinetobacter baumannii et biofilm	30
3. Implication de l'Acinetobacter baumannii dans les infections associées aux soins 30	
3.1. Généralités	30
3.2. Acinetobacter baumannii et IAS	31
CHAPITRE III : ACINETOBACTER BAUMANNII ET LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	32
1. Définition de la résistance	32
2. Support génétique de la résistance	33
3. Définition de la résistance naturelle	33
4. Profil sauvage de Acinetobacter baumannii	34
5. Définition de la résistance acquise	35
6. Résistances fréquentes chez Acinetobacter baumannii	35
7. Souches BMR et BTR chez Acinetobacter baumannii	37

DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE	39
Matériels et Méthodes	40
1. Présentation de l'étude	40
2. Objectif de l'étude	40
3. Méthodologie	41
3.1. Matériels biologiques	41
3.2. Analyse des prélèvements	42
3.2.1. Examen microscopique	43
a) Etat frais	43
b) Coloration au bleu de méthylène	44
c) Coloration de Gram	45
3.2.2. Isolement des souches d'<i>A. baumannii</i> sur les milieux de cultures appropriés	47
3.2.3. Oxydase	48
3.2.4. Catalase	50
3.2.5. Identification du genre et de l'espèce	51
3.2.6. La galerie Api 20 NE	51
3.2.7. La galerie Api 20 E	54
3.2.8. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques selon les normes du CLSI	57
3.2.8.1. Antibiogramme	57
3.2.8.2. Contrôle de qualité de l'antibiotique	60
3.2.8.3. Recherche de la BLSE	63
a) Définition d'une BLSE	63
b) Quand rechercher une BLSE	63
c) Méthodes de détection de la BLSE	63
c.1 Test de synergie	63
c.2 Test de confirmation ou technique du double disque	64
3.2.8.4. Détermination de la CMI pour étude de la sensibilité à la colistine	65
a) Technique de dilution en gélose	65
b) Technique du E-Test pour étude de la sensibilité à la colistine	68
4. Collecte et analyse des résultats : grâce au logiciel Whonet 5.6	72
Résultats et discussion	75
1. Souches <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à la Ceftazidime (CAZ)	78
2. Souches <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à la Ciprofloxacine (CIP)	79
3. Souches <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à l'Imipénème(IMP)	81

4. <i>Acinetobacter baumannii</i> producteur de bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE+)	82
5. Souches <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à toutes les molécules testées.....	84
5.1. Répartition des 25 souches par type de prélèvement et par service de provenance :	84
5.2. La colistine arme contre les souches résistantes à toutes molécules testées....	86
6. Discussion.....	86
Conclusion.....	91
Références Bibliographiques.....	94
Annexes	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : <i>Acinetobacter</i> dans un prélèvement pulmonaire. (Hidri, 2012)	20
Figure 2 : <i>Acinetobacter</i> cocco-bacillaè Gram variable. (Hidri, 2012).....	20
Figure 3 : Aspect coccoïde à Gram variable. (Hidri, 2012)	21
Figure 4 : Culture d'une souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> sur gélose Trypticase soja : colonies « smooths » ou muqueuses. (Hidri, 2012)	22
Figure 5 : Culture d'une souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> sur gélose Trypticase soja : colonies « rough » ou rugueuses. (Hidri, 2012)	23
Figure 6 : Api 20E d'une souche d' <i>Acinetobacter baumannii</i> . (Hidri, 2012).....	24
Figure 7 : Biofilm bactérien mixte. (Filloux et Vallet, 2003)	27
Figure 8 : formation du biofilm. (Willey et al., 2008).....	28
Figure 10 : Biofilm à la surface d'un stromatolites dans Walker Lake (Nevada, USA), un lac alcalin. (Willey et al., 2008)	29
Figure 11 : Photo prise lors d'une chirurgie pour enlever un biofilm artificiel au niveau de la jonction d'une articulation. (Willey et al., 2008)	30
Figure 12 : <i>Acinetobacter baumannii</i> profil sauvage. (Bertholom, 2015).....	35
Figure 13 : phénotypes de résistance habituels d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
Figure 15 : Etapes d'une étude cytobactériologique d'un prélèvement.....	43
Figure 16 (originale) : aspect microscopique de <i>Acinetobacter baumannii</i> à l'état frais. Les flèches indiquent les cellules individualisées de <i>Acinetobacter baumannii</i> (×400).....	44
Figure 17 (originale) : Aspect de <i>Acinetobacter baumannii</i> après coloration au bleu de méthylène (×1000).	45
Figure 18 (originale) : Observation de <i>Acinetobacter baumannii</i> au microscope optique après coloration de Gram, les flèches indiquent les cellules individualisées de <i>A. baumannii</i> (×1000).....	47
Figure 19 (originale) : Observation macroscopique après culture de 24 h des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> sur milieu GN.	48
Figure 20 (originale) : Résultat du test à l'oxydase (la zone entourée) des souches <i>Acinetobacter baumannii</i>	49
Figure 21 (originale) : Résultat du test à la catalase des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> . 51	
Figure 22 (originale) : Identification biochimique des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> sur galerie Api 20 NE.....	54
Figure 23 (originale) : Identification biochimique des souches <i>Acinetobacter baumannii</i> sur galerie Api 20 E.....	57
Figure 24 (originale) : Aspect de zones d'inhibition des disques d'antibiotique pour une souche <i>Acinetobacter baumannii</i>	59
Figure 25 (originale) : contrôle de qualité de l'antibiogramme, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	62
Figure 26 (originale) : Dépôt de spots bactériens pour la détermination du CMI par la technique de dilution en gélose.	67
Figure 27 (originale) : lecture des CMI.....	68

Figure 28 (originale) : Zone d'inhibition d'une bandelette à CMI pour une souche <i>Acinetobacter baumannii</i> .	70
--	----

LISTE DES TABLEAUX

Figure 27 (originale) : Capture d'écran du logiciel Whonet 5.6.	74
Tableau 1 : Bêta-lactamases décrites chez <i>Acinetobacter baumannii</i> .	37
Tableau 2 : Méthode de réalisation et les conditions de transport des prélèvements.	41
Tableau 3 : Souches de contrôle de qualité de l'antibiogramme.	61
Tableau 4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour <i>Acinetobacter spp.</i>	71
Tableau 5 : Répartition des souches colligées selon le service de provenance.	76
Tableau 6 : Répartition des souches colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	77
Tableau 7 : Répartition des souches CAZ résistant colligées selon le service de provenance.	78
Tableau 8 : Répartition des souches CAZ résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	78
Tableau 9 : Répartition des souches CIP résistant colligées selon le service de provenance.	80
Tableau 10 : Répartition des souches CIP résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	80
Tableau 11 : Répartition des souches IMP résistant colligées selon le service de provenance.	81
Tableau 12 : Répartition des souches IMP résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	82
Tableau 13 : Répartition des souches BLSE positif colligées selon le service de provenance.	83
Tableau 14 : Répartition des souches BLSE positif colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	83
Tableau 15 : Répartition des 25 souches colligées selon le service de provenance.	84
Tableau 16 : Répartition des souches pan-résistantes colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.	85
Tableau 17 : comparaison des résultats de notre étude avec les rapports AARN sur la résistance aux antibiotiques et le BLSE.	88
Tableau 18 : comparaison des résultats de notre étude avec les rapports AARN sur la résistance aux antibiotiques chez les patients internes et externes.	88

LISTE DES ABREVIATIONS

AARN :Algerian AntibioticsResistance Network (anglais) ; Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (français).

As: abcès.

ATB: antibiogramme.

ATM:monobactame.

At : aspiration trachéale.

Au : autres.

BIC :bacteria inhibition concentration (anglais) ; concentration minimale bactéricide (français).

BLSE : β lactamase à spectre large.

BMR : bactérie multi-résistante.

Br : bronchique.

C1G : céphalosporine de 1re génération.

C2G : céphalosporine de 2e génération.

C3G : céphalosporines de 3e génération.

Ca : cathéter.

CAZ : ceftazidime.

Cc : cathéter central.

Chir : chirurgie.

CHN : les hypersécrétions de Case.

CIP : ciprofloxacine.

CLSI :clinical-laboratorystandardsinstitute.

CMI : concentration minimale inhibitrice.

CTX :ceftriaxone.

Dn : drain.

Dial : hémodialyse.

FE : faible effectif, nombres de souches testés inférieures à 30.

FEP:céfépime

Fi:fistule.

Go: gorge.

Hem :cachémato.

IMP :imipenème.

Kt : cathéter + cathéter central.

Lc : liquide céphalo-rachidien.

Med : médecine interne

Nchir : neuro chirurgie.

Neur : neurologie.

OMP : protéine de la membrane externe.

Onc :cac oncologie.

Or : oreille.

Orl :OtoRhinoLaryngologie.

Os : os.

Out : externes.

Pa : plaie.

Pc : plaie chirurgicale.

Pr : prothèse.

Ps : pus.

Rea : réanimation.

Reed: rééducation

Sa : sang.

SENTRY : Programme de surveillance antimicrobienne.

TCC : ticarcilline+acide clavulanique

Trau: traumatologie-orthopédie.

Ur : urine.

Va : vagin.

Introduction

Acinetobacterbaumannii est un bacille à Gram négatif aérobie, pléomorphe et non-motile. C'est un pathogène opportuniste, avec une forte incidence chez les sujets immunodéprimés, en particulier ceux qui ont connu un séjour prolongé à l'hôpital (plus de 90 jours).

Communément associé avec les milieux aquatiques, il a été montré qu'il pouvait coloniser la peau et a été isolé en grand nombre à partir des sécrétions respiratoires et de l'oropharynx des personnes infectées.

Au cours des dernières années, il a été désigné comme un agent d' "alerte rouge" en pathologie humaine, générant l'alarme parmi la fraternité médicale, découlant en grande partie de son vaste spectre de résistance aux antibiotiques ; en effet *Acinetobacterbaumannii* est naturellement résistant à beaucoup d'antibiotiques et peut également acquérir de nouveaux mécanismes de résistance conduisant à une multirésistance voire à une totorésistance, générant ainsi des impasses thérapeutiques aux conséquences parfois fatales ; et d'autant plus qu'il présente un pouvoir épidémiogène non négligeable.

Vu cette multirésistance et le pouvoir épidémiogène important, nous nous sommes intéressés à cette bactérie. Ainsi sur une période de 3 ans, de 2013 à 2015, il nous a paru important de recenser toutes les souches *Acinetobacterbaumannii* isolés au laboratoire de microbiologie du CHU Blida unité Frantz Fanon, connaître le nombre de souches multirésistantes et le nombre de souches résistantes à toutes les molécules testées. Nous avons également évalué la répartition de ces souches dans les différents services, et sur les différents prélèvements. Dans le but de dégager le service le plus touchés par les infections à *Acinetobacterbaumannii* et le prélèvement d'où l'on recense le plus d'isolats.

Les souches résistantes à toutes les molécules testées ont été testées à la colistine. En effet cette molécule est documentée comme étant le dernier recours thérapeutique aux infections à *Acinetobacterbaumannii*.

Nous avons testé 25 souches à la colistine, et toutes les souches étaient sensibles à la colistine.

Nous proposerons quelques idées et perspectives, pour contribuer aux efforts de lutte contre les infections à *Acinetobacterbaumannii* en générale et contre les souches épidémiques en particulier.

PREMIERE PARTIE :
ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : *ACINETOBACTER BAUMANNII* HABITAT ET CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

1. Habitat

Les organismes appartenant au genre *Acinetobacter* sont souvent considérés comme étant omniprésents dans la nature dans la mesure où ils peuvent être récupérés à partir de presque tous les échantillons d'eau du sol et de surface.

Les *Acinetobacter* sont des micro-organismes ubiquistes de l'environnement naturel et hospitalier, présents dans le sol, l'eau, les milieux aquatiques, les eaux d'égout ; ils peuvent survivre à la fois sur les surfaces humides et sèches. (Denis et al., 2007)

Acinetobacterbaumannii fait partie de la flore cutanée de l'homme et des animaux, c'est un agent fréquent de colonisation cutanée et muqueuse chez les patients hospitalisés en unités de soin intensifs. (Denis et al., 2007)

Il peut être retrouvée en situation de portage chez l'homme : au niveau de la peau et du tube digestif... (Grosjean et al., 2011)

2. Caractères bactériologiques

2.1. Taxonomie :

Le genre *Acinetobacter* comprend actuellement 32 espèces dont 17 ont reçu un nom valide par les comités de nomenclature. D'autres n'ont pas reçu de nom du fait de la difficulté de l'identification par les procédés traditionnels. (Denis et al., 2007)

Le genre *Acinetobacter* est désormais inclus dans la famille des moraxellaceae, elle-même incluse dans l'ordre des pseudomonadales. Les infections humaines sont dues principalement à *A. baumannii* mais d'autres espèces sont accessoirement impliquées comme :

A. calcoaceticus, *Acinetobacter spp.3*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *Acinetobacter spp.13* (Tjernberg et Ursing), *A. ursingii*, et *A. schindleri*. (Denis et al., 2007)

Le genre *Acinetobacter*, telle que définie actuellement, comprend les bacilles Gram négatif, aérobies strictes, non-fermentants, non fastidieux, non mobiles, les bactéries oxydase-négatives, catalase positives avec une teneur d'ADN G + C de 39% à 47%.

Le test de transformation proposé par Juni fait office de référence pour identifier une souche au niveau du genre *Acinetobacter*. Ce test repose sur la capacité de la souche mutante de *A. baylyi* BD413 *trpE27* à être transformé par l'ADN brut de toute espèce d'*Acinetobacter* à un phénotype de type sauvage. (Denis et al., 2007)

2.2. Caractères morphologiques

Les *Acinetobacter* sont définis comme des diplo-coccobacilles à Gram négatif.

Comme leur nom l'indique, les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* sont immobiles (acineto venant du grec "akinetos," ce qui signifie non mobiles).

Ils sont non sporulés, associés en paires ou en courtes chaînettes.

Trente pour cent (30%) des souches d'*Acinetobacter baumannii* possèdent une capsule, que l'on peut identifier à la coloration de Gram par le halo clair qui entoure la bactérie (figure 1).

Quelquefois de décoloration difficile, ils sont considérés à Gram variable (figure 2). (Hidri, 2012)

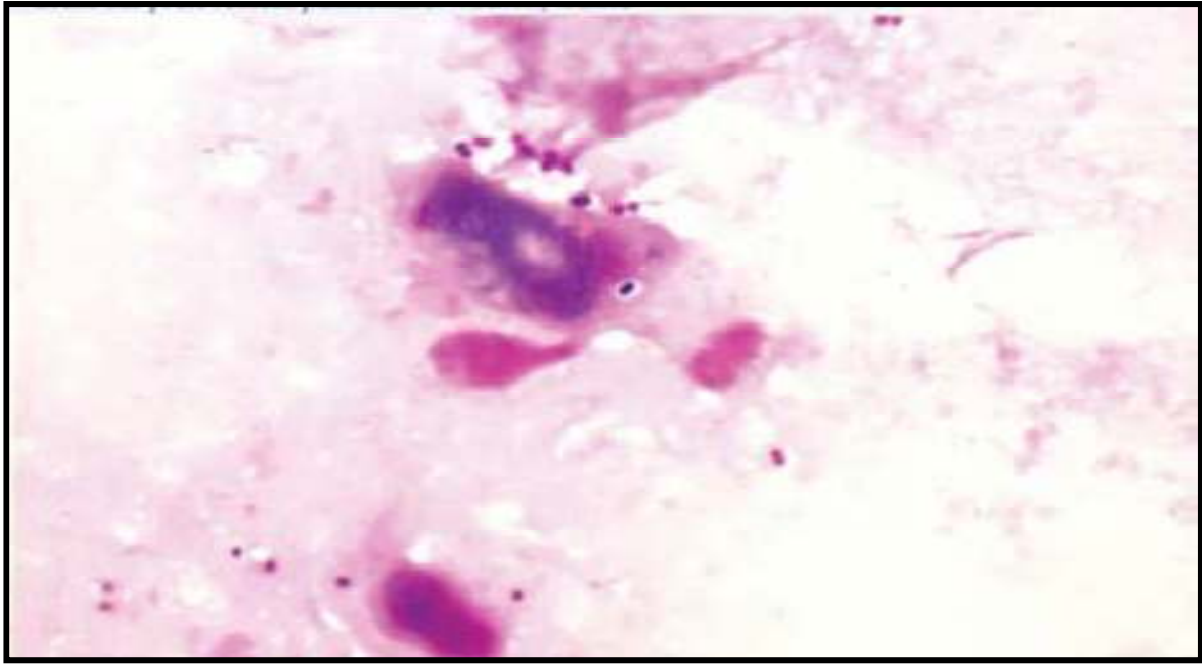


Figure 1 : *Acinetobacter* dans un prélèvement pulmonaire. (Hidri, 2012)

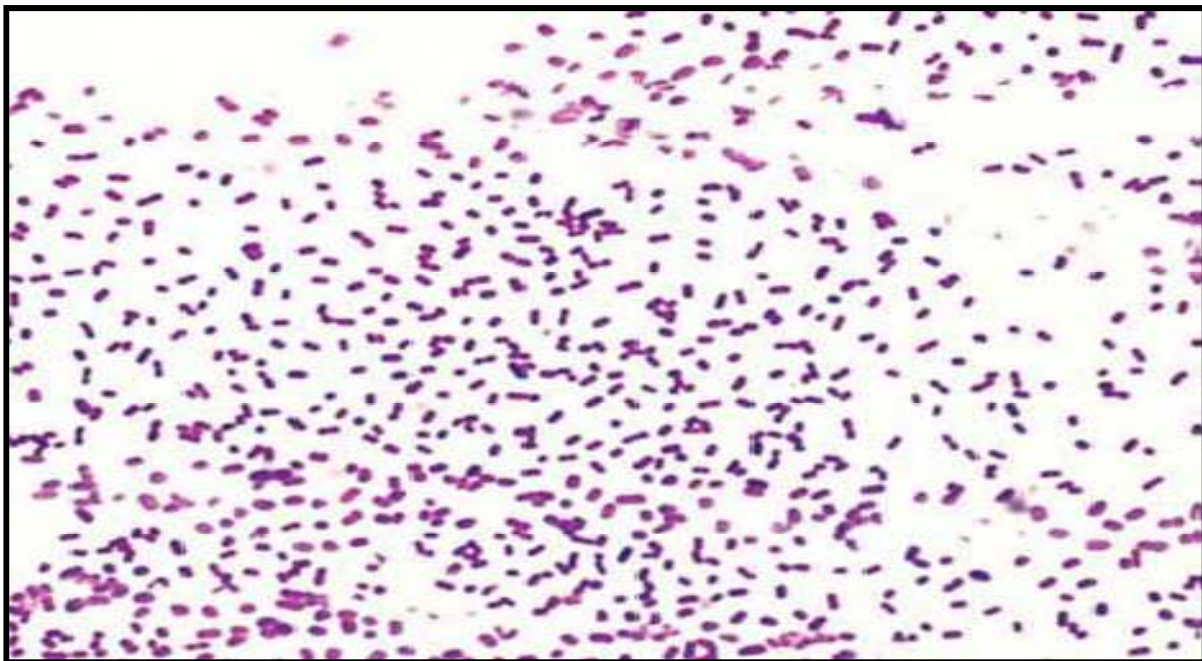


Figure 2 : *Acinetobacter* cocco-bacille à Gram variable. (Hidri, 2012)

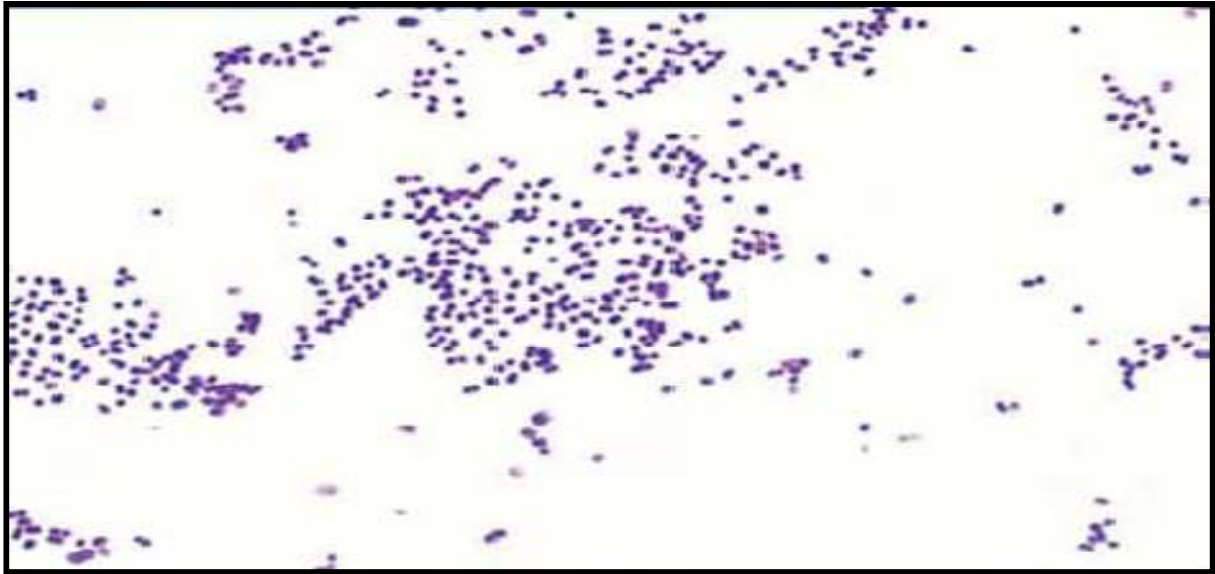


Figure 3 :Aspect coccoïde à Gram variable. (Hidri, 2012)

2.3. Caractères cultureux

Les bactéries appartenant à l'espèce *Acinetobacterbaumannii* sont des bactéries aérobies stricts, catalase positive et oxydase négative.

Ils cultivent facilement sur les milieux usuels en 24 heures en donnant des colonies arrondies à bords lisses, réguliers.

L'isolement en milieu solide peut être obtenu après incubation à température comprise entre 30 et 37 °C sur milieux conventionnels (gélose au sang, gélose « chocolat », gélose trypticase soja, gélose BCP, etc.)

Seules les espèces *A. baumannii* et certaines souches du groupe génomique 13 T&U (*A. nosocomialis* sp. nov) sont capables de croître à 44 °C, caractère particulièrement utile pour leur identification.

Sur les milieux dédiés aux bacilles à gram négatif comme la gélose Mac Conkey ou la gélose de Drigalski, les colonies apparaissent en général lactose négatif sur les milieux lactosés car lorsque l'attaque oxydative du lactose a lieu celle-ci est souvent retardée. (Denis et al., 2007)

Les souches capsulées sont facilement identifiables en culture. Elles présentent un aspect muqueux ou « smooth » alors que les colonies de souches non capsulées sont plus petites et présentent un aspect rugueux ou « rough » (figure 4 et 5). (Hidri, 2012)



Figure 4 : Culture d'une souche d'*Acinetobacter baumannii* sur gélose Trypticase soja : colonies « smooths » ou muqueuses. (Hidri, 2012)



Figure 5 : Culture d'une souche d'*Acinetobacterbaumannii* sur gélose Trypticase soja : colonies « rough » ou rugueuses. (Hidri, 2012)

2.4. Caractères biochimiques

Sur galerie Api 20E : peu de caractères positifs. Les résultats évocateurs d'*Acinetobacterbaumannii* sont la positivité du glucose, du melibiose et de l'arabinose (figure 6). En pratique quotidienne dans le laboratoire de bactériologie classique, ils ne permettent pas la différenciation entre les différentes espèces d'*Acinetobacter*, car ils sont trop difficiles à mettre en œuvre. Les tests biochimiques habituels pour le genre *Acinetobacterspp*sont en majorité négatifs : nitrate réductase, LDC et ODC négatives, H₂S et indoles négatifs. De plus, les espèces du complexe, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobactersp.* 3 et le groupe génomique 13 T&U sont encore plus difficiles à différencier phénotypiquement.

Sur galeries Api 20NE, ou pour les automates type Vitek 2 (bioMérieux), l'identification est facile pour toutes les souches d'*Acinetobacter* au rang de genre mais pas au rang d'espèce. L'association de ces critères au rang de genre, associé à la température de croissance positive à 44° permet de donner le nom d'*Acinetobacterbaumannii*. (Hidri, 2012)



Figure 6 :Api 20E d'une souche d'*Acinetobacterbaumannii*. (Hidri, 2012)

CHAPITRE II : POUVOIR PATHOGENE DE L'*ACINETOBACTER BAUMANNII*

1. Pouvoir pathogène de l'*Acinetobacterbaumannii*

Acinetobacterbaumannii est un agent fréquent d'infection nosocomiale qui concerne essentiellement l'arbre respiratoire, l'appareil urinaire, les plaies, notamment sur cathéter, et peuvent évoluer vers une bactériémie. D'autres manifestations cliniques ont été observées : pleurésies, péritonites chez les dialysés, méningites, etc. Ces infections se manifestent souvent par bouffées épidémiques et sont dues à des souches multirésistantes. Un traitement antibiotique, un acte chirurgical et un séjour dans une unité de soins intensifs constituent les principaux facteurs de risque à la survenue de ces infections. (Denis et al.,2007)

Plus récemment, cette bactérie s'est illustrée comme une cause d'infection grave sur des plaies de guerre lors des conflits en Afghanistan et en Irak avec plus de 100 cas de bactériémies reportées. (Denis et al.,2007)

Les Acinetobacter sont également capables de provoquer des infections communautaires suite à une plaie traumatique chez les sujets normaux.

2. Facteurs de pathogénicité de l'*Acinetobacterbaumannii*

La pathogénicité de cette bactérie est due à l'expression de ses facteurs de virulence et à sa capacité à la constitution de biofilm

2.1. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence sont encore mal élucidés. Le pouvoir pathogène expérimental a été démontré chez les souris grâce à un modelé de pneumopathie obtenu après administration intratrachéale d'*A. baumannii*.

Cependant certains de ces facteurs sont connus tels que :

Le lipopolysaccharide :Acinetobacter, à l'instar des autres bacilles à gram négatif, est doté d'un lipopolysaccharideaux propriétés d'endotoxine.

La capsule : qui est vraisemblablement un élément majeur de la virulence, protégeant la bactérie de la phagocytose.

Le slime : certaines souches produisent des polysaccharides de surface (slime) qui inhibent la migration des polynucléaires neutrophiles. (Denis et *al.*,2007)

L'OmpA : un membre des protéines de la membrane externe (OMP), contribue significativement à la maladie. Elle se lie à l'épithélium de l'hôte et aux mitochondries. Une fois lié à ces derniers, elle induit un dysfonctionnement mitochondrial et provoque leur gonflement. Cela est suivi par la libération de cytochrome C, une protéine hème, qui conduit à la formation de l'apoptosome. Ces réactions contribuent tous à l'apoptose de la cellule.

L'OmpA, la protéine de surface la plus abondante de l'agent pathogène, est également impliqué dans la résistance au complément et à la formation de biofilms, deux stratégies clés de survie au stress et de probables importants facteurs de virulence associés qui contribuent à promouvoir la survie des bactéries à l'intérieur et l'extérieur de l'hôte. (Howard et *al.*, 2012)

Les protéines phospholipase D et C : Alors que la phospholipase D est importante pour la résistance au sérum humain, l'évasion aux cellules épithéliales et la pathogénèse, la phospholipase C augmente la toxicité pour les cellules épithéliales.

Les fimbriae : également exprimés à la surface de la cellule bactérienne, contribuent à l'adhérence de l'agent pathogène aux épithéliums de l'hôte. (Denis et *al.*,2007)

2.2. Constitution de biofilm

2.2.1. Définition du biofilm

La définition du biofilm communément admise est celle de Donlan et Costerton : « un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à un substrat, une interface ou tout simplement entre elles, enrobées d'une matrice extracellulaire de substances polymériques (en général d'exopolysaccharides) qu'elles ont elles-mêmes produites et qui présentent un phénotype particulier en termes de taux de croissance et de transcription de gènes ».

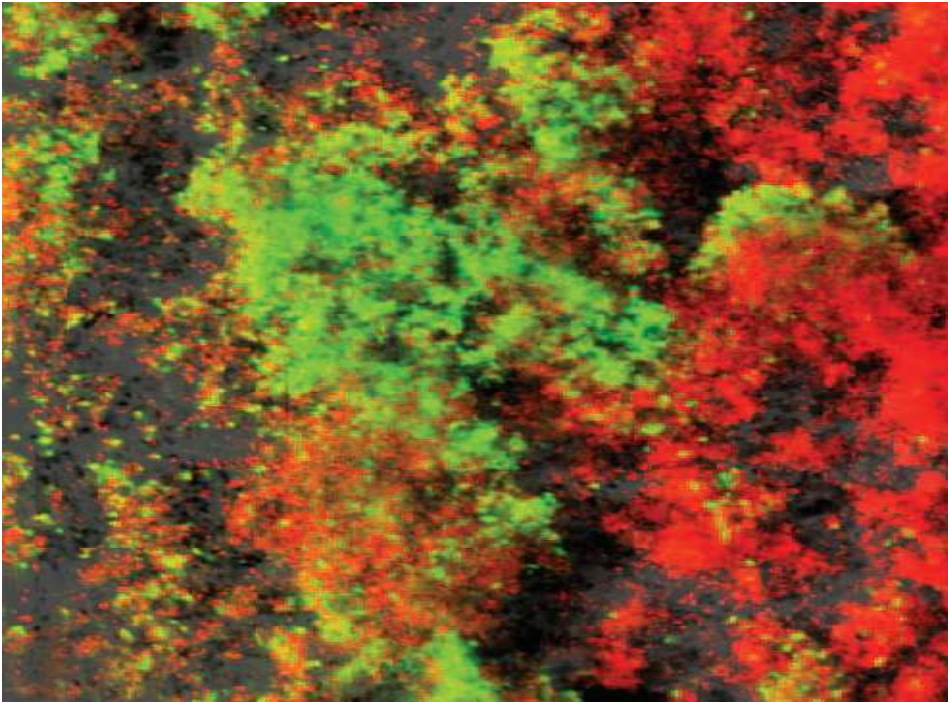


Figure 7 : Biofilm bactérien mixte. (Filloux et Vallet, 2003)

2.2.2. Etapes de la constitution du biofilm

Le biofilm se définit comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide. L'étape initiale d'attachement fait intervenir des appendices générateurs de mouvement qui permettent d'approcher la surface à coloniser. Cette approche conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. Dans un deuxième temps, une association stable avec la surface ou avec d'autres micro-organismes déjà présents s'établit. Ces rassemblements de bactéries conduisent à la formation de micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm. La matrice d'exopolysaccharide, représente quelque 85 % du volume total. Cette matrice renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité. Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'exopolysaccharide et être utilisé par les bactéries. Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un micro-environnement anaérobie. Cette

observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure.

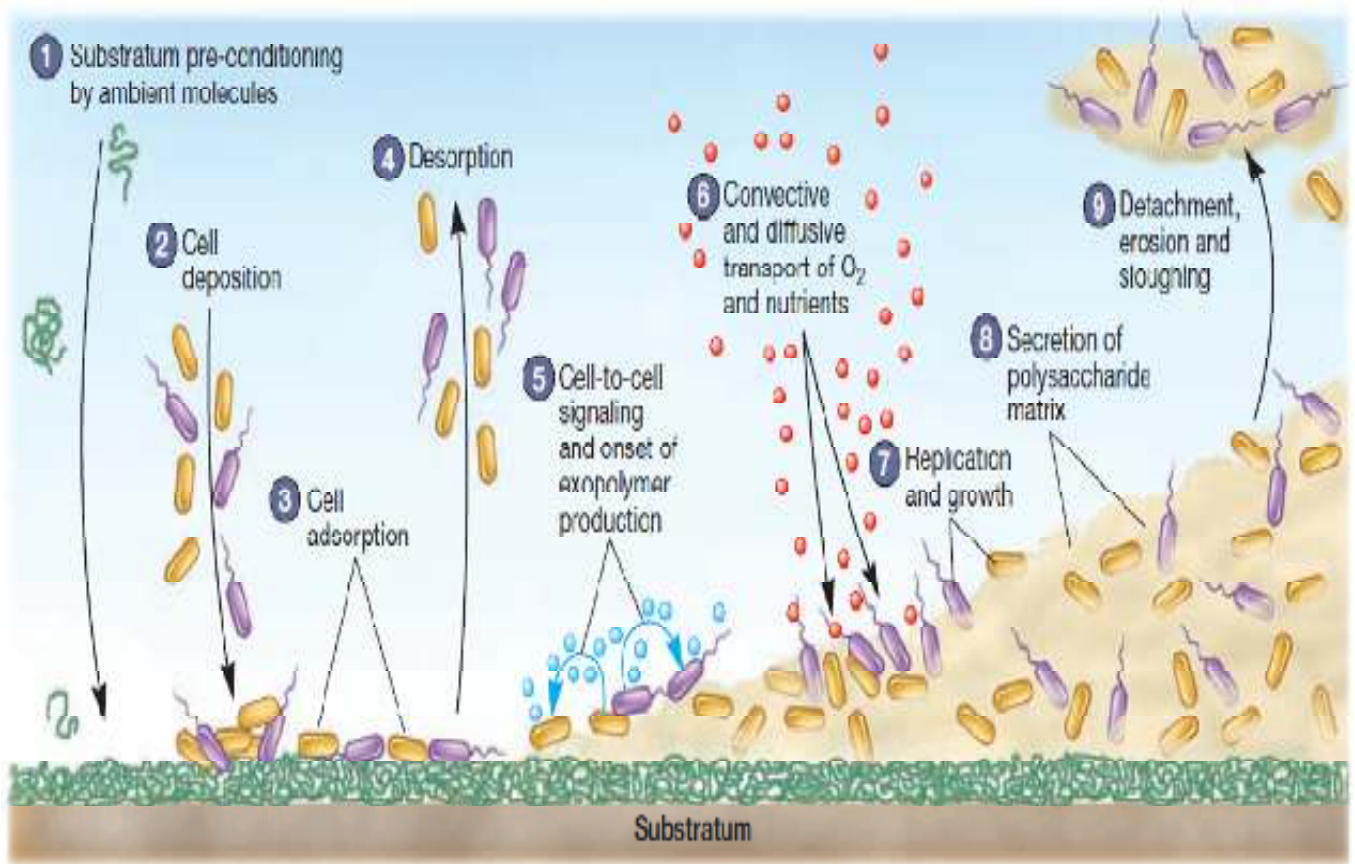


Figure 8 :formation du biofilm.(Willey et al., 2008)

2.2.3. Propriétés du biofilm

Les scientifiques ont observé dès les années 1940 que dans les milieux aquatiques, bien plus de microbes étaient fixés sur les surfaces (sessiles) qu'il y en avait flottant librement (planctoniques), ce fait n'a attiré l'attention des microbiologistes que récemment. Ces microbes attachés sont membres de communautés complexes, enfermées, appelées biofilms. Les biofilms sont omniprésents dans la nature.

Une préoccupation majeure est la formation de biofilms sur les dispositifs médicaux tels que les implants hanche et du genou (figure 11).

Ces biofilms sont souvent la cause des maladies graves et l'échec du dispositif médical.

La formation du biofilm est apparemment une propriété ancienne chez les procaryotes. Les biofilms peuvent se former sur pratiquement toutes les surfaces, une fois qu'ils ont été conditionnés par des protéines et d'autres molécules présentes dans l'environnement (figure 9).

Dans le biofilm, les microbes sont protégés contre de nombreux agents nocifs tels que la lumière UV, des antibiotiques et d'autres agents antimicrobiens. Cela est dû en partie à la matrice extracellulaire dans laquelle ils sont incorporés, mais il est également dû à des changements physiologiques.

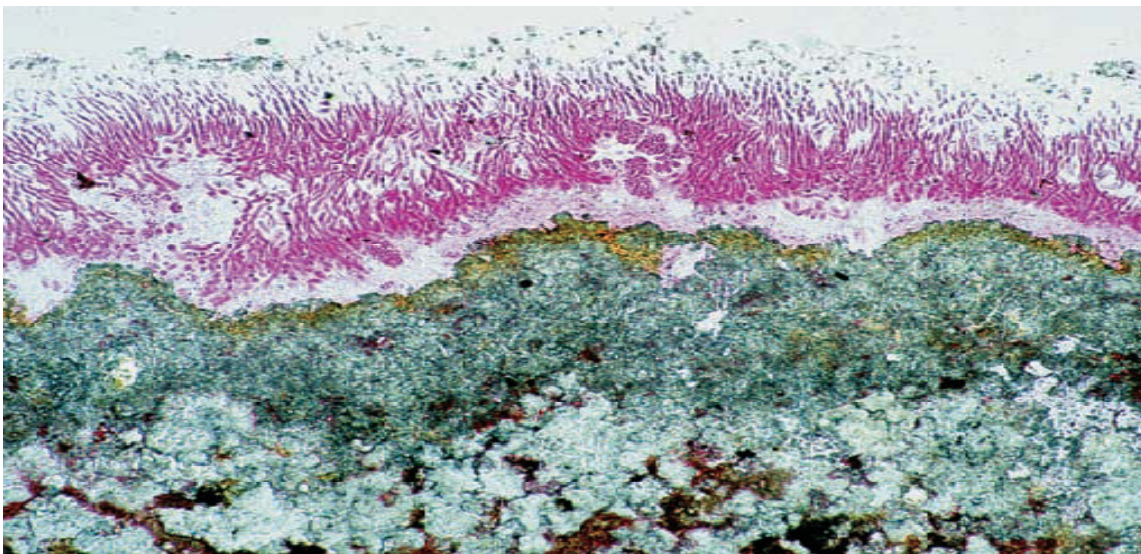


Figure 9 :Biofilm à la surface d'un stromatolites dans Walker Lake (Nevada, USA), un lac alcalin.(Willey et *al.*, 2008)



Figure 10 : Photo prise lors d'une chirurgie pour enlever un biofilm artificiel au niveau de la jonction d'une articulation. (Willey et al., 2008)

2.2.4. *Acinetobacterbaumannii* et biofilm

Des études ont été menées sur la capacité et le mécanisme de formation de biofilm par *Acinetobacterbaumannii*. La capacité d'*A. baumannii* à former un biofilm est un facteur de virulence important puisque le biofilm permet la survie à long terme en milieu hospitalier et offre une résistance aux antimicrobiens pendant le traitement de l'infection.

La formation de biofilm chez les isolats *A. baumannii* peut être influencée par plusieurs facteurs. Cette diversité montre qu'une souche particulière peut exercer différentes tendances de formation de biofilm dans des conditions différentes. Les valeurs beaucoup plus élevées de BIC (concentration minimum bactéricide) en comparaison avec les valeurs de CMI (concentration minimum inhibitrice), comme indiqué par diverses études, indiquent que la thérapie antimicrobienne des bactéries productrices de biofilm est plus difficile. Cette capacité rendra plus difficile le traitement des infections et ce fait devrait être pris en considération lorsque des protocoles de traitement sont établis. En la présence potentielle d'un *A. baumannii* hautement productrice de biofilm, on devrait se rappeler que l'activité thérapeutique peut varier quand on prévoit de traiter les infections par la colistine.

3. Implication de l'*Acinetobacterbaumannii* dans les infections associées aux soins

3.1. Généralités

Une infection est dite associée aux soins (IAS) si elle survient au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) et si elle n'était pas présente et/ou en incubation au début de la prise en charge.

Lorsque que l'état infectieux au début de la prise en charge n'est pas connu précisément, un délai d'au moins 48 heures ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une IAS. Toutefois, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la plausibilité de l'association entre la prise en charge et l'infection.

Pour les infections du site opératoire, on considère habituellement comme associées aux soins les infections survenant dans les 30 jours suivant l'intervention ou, s'il y a mise en place d'un implant, d'une prothèse ou d'un matériel prothétique dans l'année qui suit l'intervention. Toutefois, et quel que soit le délai de survenue, il est recommandé d'apprécier dans chaque cas la plausibilité de l'association entre l'intervention et l'infection, notamment en prenant en compte le type de germe en cause.

L'IAS comprend l'infection nosocomiale, au sens de contractée dans un établissement de santé, et couvre également les soins délivrés en dehors des établissements de santé.

Il existe plusieurs types d'infections nosocomiales relevant de modes de transmission différents :

- Les infections d'origine « endogène » : le malade s'infecte avec ses propres microorganismes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière ;
- Les infections d'origine « exogène » ; il peut s'agir :
 - Soit d'infections croisées, transmises d'un malade à l'autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical ;
 - Soit d'infections provoquées par les microorganismes portés par le personnel ;
 - Soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...).

3.2. *Acinetobacterbaumannii* et IAS

Depuis une vingtaine d'années, *Acinetobacterbaumannii* a pris place parmi les bactéries multi résistantes (BMR), elle est devenue de plus en plus un agent important d'infections associées aux soins.

Les caractéristiques les plus remarquables de l'*A.baumannii* comme pathogène nosocomial sont sa capacité à survivre dans l'environnement hospitalier et de développer une résistance à plusieurs agents antimicrobiens.

On note l'existence de deux types de souches : les souches sporadiques et les souches épidémiques ; ces dernières semblent combiner la résistance aux antimicrobiens et la capacité de se propager, tout en maintenant leur virulence clinique.

Jusqu'à présent, les unités de soins intensifs (USI) ont été considérés comme les épicentres de l'épidémiologie de *A. baumannii*. Néanmoins, la diffusion aux pupilles classiques se produisent, et dans certaines régions, les établissements de soins à long terme ont récemment joué un rôle important.

CHAPITRE III : *ACINETOBACTER BAUMANNII* ET LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

1. Définition de la résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques a deux définitions :

Une souche est dite "résistante" lorsqu'elle est capable de se développer en présence d'une concentration d'antibiotique plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce.

Une souche est dite "résistante" lorsque la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est plus élevée que la concentration que l'on peut atteindre in vivo.

Mécanismes de l'antibiorésistance :

Comment une bactérie peut devenir résistante ?

Pour être efficace, un antibiotique doit

- 1) parvenir au contact de la bactérie
- 2) pénétrer dans la bactérie
- 2) demeurer sous forme active
- 3) posséder une cible bactérienne spécifique
- 4) perturber ainsi la physiologie bactérienne

Les conditions de l'activité d'un ATB	Mécanismes de résistance
Posséder une cible bactérienne spécifique	Modification de la structure de leurs cibles
Demeurer sous forme active	Production d'enzymes capables d'inactiver l'ATB
Accéder à la cible	Se rendre imperméable à la Pénétration de l'ATB

Si l'une de ces conditions n'est pas remplie, l'antibiotique se révèle inefficace donc la bactérie est dite RESISTANTE.

2. Support génétique de la résistance

La résistance naturelle est programmée dans le génome bactérien : Chromosome

Les modifications génétiques responsables de résistance acquise sont :

❖ Chromosomiques :

Secondaires à une mutation portant sur le chromosome résistances mutationnelles, elles sont:

*Spontanées : elles préexistent à l'utilisation de l'antibiotique ;

*Spécifiques : elles n'intéressent qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ;

*Stables : elles se transmettent verticalement dans le clone bactérien ;

*Rares : le taux de mutation se situe habituellement entre 10^{-7} et 10^{-8} .

❖ Extra-chromosomiques :

Acquisition de gènes ; dont le support est un plasmide ou un transposon acquis par conjugaison ou par transformation ou plus rarement par transduction.

* Elles sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises) ;

*elles sont contagieuses et se transmettent horizontalement entre bactéries ;

*elles peuvent concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques, entraînant une polyrésistance.

3. Définition de la résistance naturelle

La résistance naturelle d'une espèce ou d'un genre est une caractéristique propre de l'ensemble des souches de cette espèce ou de ce genre.

Elle est Programmée sur les génomes bactériens, donc fixe et constant sur le génome.

Elle définit le phénotype sauvage.

Elle Constitue un critère d'identification.

Elle permet de définir une antibiothérapie probabiliste et prophylactique.

4. Profil sauvage de *Acinetobacterbaumannii*

Acinetobacterbaumannii est résistant naturellement aux molécules suivantes : aminopenicillines, cephalosporines 1ère et 2ème génération, fosfomycine, triméthoprim, furanes. *A. baumannii* est également naturellement résistant à l'**ertapénème**, à l'**acide pipémidique**, à la **norfloxacine** (mais pas à l'acide nalidixique).**(Decré, 2012)**

A. baumannii dispose d'un **nombre de porines inférieur** à celles retrouvées chez *E. coli* et, de ce fait, présente une imperméabilité naturelle. Cette imperméabilité est associée à une pompe à efflux, naturellement active vis-à-vis d'un large spectre d'antibiotiques incluant notamment le triméthoprim mais excluant les aminoglycosides.

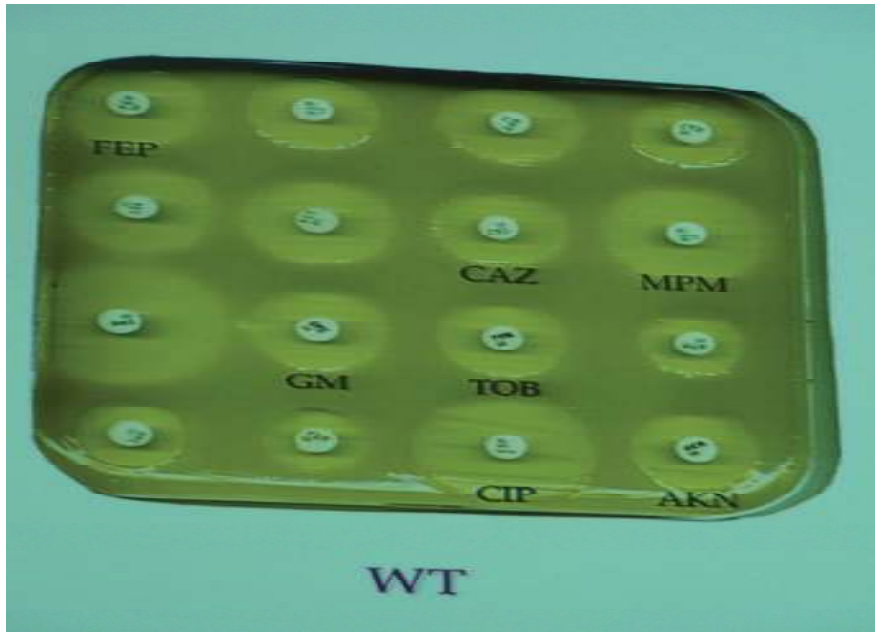


Figure 11 : *Acinetobacter baumannii* profil sauvage. (Bertholom, 2015)

5. Définition de la résistance acquise

C'est la caractéristique de certaines souches d'une même espèce bactérienne normalement sensible à un antibiotique et qui sont devenues résistantes à l'action de ce dernier, ce qui définit le phénotype de résistance acquise.

Consécutives à des modifications de l'équipement génétique (mutation de gènes endogènes ou acquisition de gènes exogènes).

Elles constituent un marqueur épidémiologique.

En matière de résistance, elle a su utiliser une variété de mécanismes :

- Mutations,
- Acquisition de séquences d'insertion jouant le rôle de promoteur de gènes silencieux,
- Acquisition de gènes de résistance à partir d'espèces plus ou moins proches sous la forme de plasmides, transposons ou cassettes d'intégrons. (Decré, 2012)

L'émergence rapide de souches multirésistantes et pan-résistantes de *Acinetobacter* souligne la capacité de l'organisme à s'acclimater rapidement aux changements sélectifs et les pressions environnementales. (Howard et al, 2012)

6. Résistances fréquentes chez *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacterbaumannii a la capacité d'acquérir facilement de nombreux gènes de résistance aux aminosides, β -lactamines, chloramphénicol, sulfamides, tétracyclines, etc. portés par des éléments mobiles (plasmides, transposons, et cassettes d'intégrons).

La résistance aux fluoroquinolones fréquemment observée, résulte de mutations de l'ADN-gyrase.

La pompe d'efflux AdeABC est responsable d'une résistance de bas niveau qui affecte l'activité des aminosides, des quinolones, des tétracyclines et de certaines β -lactamines chez de nombreuses souches cliniques.

La présence d'une β -lactamase à spectre élargi a été décrite chez les souches épidémiques. (Denis et al.,2007)

Plusieurs types de céphalosporinases ont été caractérisés chez *A. baumannii*. Elles sont maintenant appelées ADC (Acinetobacter-derived-cephalosporinase) et sont à l'origine de la résistance aux aminopénicillines, à la céfalotine et la céfoxitine chez l'espèce baumannii. (Decré, 2012)

Comme les autres enzymes de la classe C, elle n'est pas sensible aux inhibiteurs de bêta-lactamase comme l'acide clavulanique. (Decré, 2012)

L'imipénème est souvent la seule β -lactamine possible pour traiter les infections à *A. baumannii*

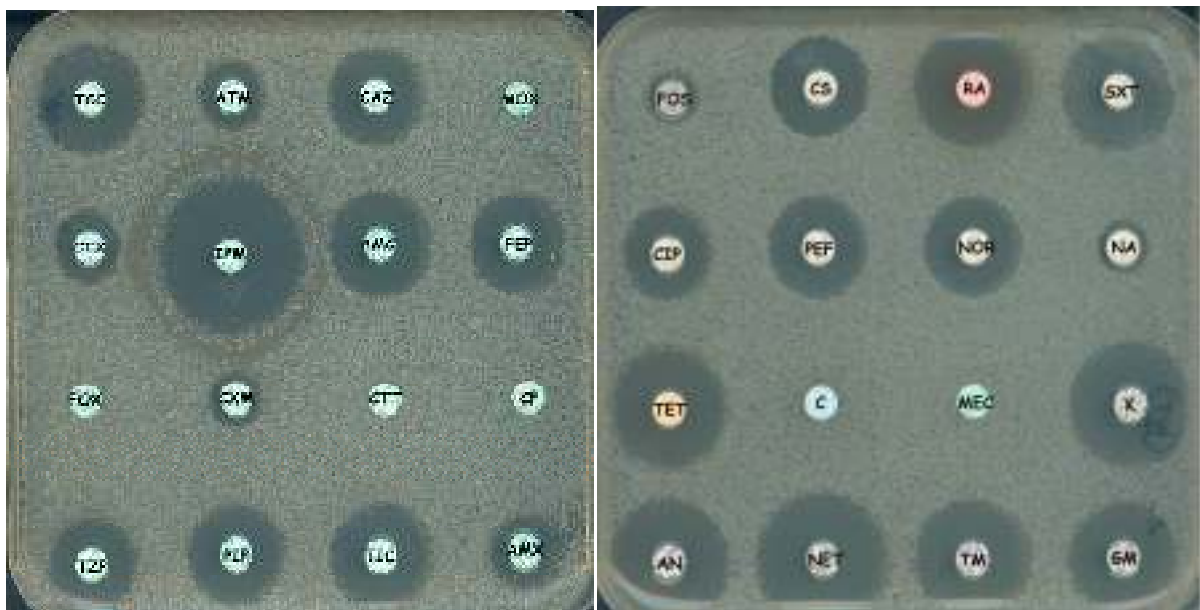


Figure 12 : phénotypes de résistance habituels d'*Acinetobacterbaumannii*.

Tableau 1 : Bêta-lactamases décrites chez *Acinetobacterbaumannii*.

Classification de Ambler	Type d'enzyme	Spectre d'activité
CLASSE A (Serine bêta-lactamase)	TEM-1,-2 ; CARB-5 SCO-1 CTX-M-2,-15 ; TEM-92 VEB-1, PER-1 ; SHV-12 GES-11 ; -14 KPC-2,-3,-4,-10	pénicillines+ C1G toutes bêta-lactamines sauf Céphamycineset carbapénèmes carbapénèmes et C3G toutes les bêta-lactamines
CLASSE B (Métallo-bêta-lactamase)	IMP-1,-2,-4,-5,-6,-11 VIM-2,-4 ; SIM-1 ; NDM-2	toutes les bêta-lactamines Saufaztreonam
CLASSE C (Sérine bêta-lactamase)	AmpC + ISAb1	Pas d'expression, non inductible Expression amplifiée de niveau variable, ampicilline, C1G, C2G (bas niveau) C3G, piperacilline + ticarcilline (haut niveau)
CLASSE D (Sérine bêta-lactamases)		
Groupe I	OXA-21 OXA-23,-27,-49	ampi-ticar-piperacilline toutes bêta- lactaminescarbapénèmesincluses
Groupe II	OXA-51,-66,-69	Pas d'activité apparente (sauf si ISAb1)
Groupe III	OXA-24,-25,-26,-37, -40,-72	toutes bêta- lactaminescarbapénèmesincluses
Groupe IV	OXA-58 OXA-143	toutes bêta- lactaminescarbapénèmesincluses pénicillines +carbapénèmes

7. Souches BMR et BTR chez *Acinetobacterbaumannii*

Toute bactérie peut acquérir des mécanismes de résistances lui permettant d'échapper à l'action des antibiotiques et de causer ainsi des problèmes thérapeutiques.

Les bactéries multi résistantes (BMR) sont des bactéries résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. Elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques et confrontent souvent le clinicien à des difficultés thérapeutiques.

Les souches *Acinetobacterbaumanni* sont dites BMR lorsqu'elles présentent une résistance à la ceftazidime (CAZ R) et/ou à l'imipénème (IMP R) et/ou à la ciprofloxacine (CIP R).

Une souche bactérienne est dite pan-résistante ou toto-résistante (BTR) lorsqu'elle est résistante à l'ensemble des antibiotiques testés selon les recommandations en vigueur et qui confronte le clinicien à une réelle impasse thérapeutique ; l'origine de cette toto-résistance est l'accumulation de mécanismes de résistance, elle intéresse particulièrement les souches hospitalières.

DEUXIEME PARTIE :

PARTIE PRATIQUE

Matérielset Méthodes

1. Présentation de l'étude

L'étude a porté sur l'ensemble des souches d'*Acinetobacterbaumanni* isolées à partir de prélèvements étudiés au niveau de l'unité de microbiologie du laboratoire central du CHU Blida, unité Frantz-Fanon, et ce sur une période étalée sur 03 ans (De Janvier 2013 à Décembre 2015).

Nous avons inclus l'ensemble des souches *A. baumannii* isolées, quelques soit le type de prélèvement ou sa provenance.

2. Objectif de l'étude

Il était de définir le nombre d'*Acinetobaterbaumanni* isolés ;

Rechercher et définir le taux d'*A.baumannii* multirésistants (BMR) ;

Rechercher et définir le taux d'*A.baumannii* pan-résistant ou toto-résistants(BTR) ;

Ainsi que leur distribution selon le type de service et de prélèvement ;

Mais aussi d'étudier la sensibilité à la colistine pour les souches BMR.

Deux volets sont dégagés : l'un rétrospectif, concerne la recherche et la définition du taux d'*Acinetobacterbaumanni* BMR et BTR, leur répartition selon le type de service et de prélèvement ; l'autre prospectif, c'est l'étude de la sensibilité à la colistine des souches résistantes à toutes les molécules testées.

3. Méthodologie

Afin de mener à bien cette étude nous avons eu besoin d'un certain nombre de matériels biologiques et non biologiques ceux sont les matériaux classiques du laboratoire de microbiologie et le logiciel Whonet 5.6.

3.1. Matériels biologiques

➤ Prélèvements

Les urines, les cathéters, les pus, les hémocultures, et les liquides céphalo-rachidien constituent les prélèvements les plus fréquents à l'origine de l'isolement de *Acinetobacterbaumanni*. Il peut également être isolé à partir de prélèvement de gorge, des fosses nasales, du nasopharynx et des voies génitales. Ces prélèvements sont issus de malades externes et internes (hospitalisés).

Les prélèvements doivent obéir à des règles strictes d'asepsie, leur réalisation se fait avant toute antibiothérapie (tableau 2).

Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignement (annexe2) sur laquelle sont mentionnées les informations sur chaque malade (Nom, Prénom, Age, Sexe, Service d'hospitalisation, Traitement antibiotique en cours).

Les méthodes de réalisation et les conditions de transport des prélèvements sont représentées dans le tableau ci-après :

Tableau 2 : Méthode de réalisation et les conditions de transport des prélèvements.

Type de prélèvement	Méthode de réalisation	Condition de transport
Urine	Urine fraîche du matin dans des flacons stériles spéciaux, en éliminant le premier jet	Immédiatement après leurs réalisations, ou le transporter à +4 °C
Pus, gorge	Ecouvillonnage à partir du	Immédiatement après leurs

	foyer infectieux	réalisations.
Hémoculture	Ponction de sang veineux ; trois prélèvements sont réalisés avec intervalle et si possible au moment d'un pic d'hyperthermie ou d'hypothermie. Le sang prélevé est mis dans des flacons spéciaux.	
LCR	Ponction lombaire	

➤ Souches de contrôle de qualité :

Ces souches sont utilisées afin de valider les différents tests de la résistance aux antibiotiques effectués. *P. aeruginosa* ATCC 27853 est la souche de référence pour le contrôle de *A. baumannii*

Ainsi qu'une **méthodologie** que voici :

- Analyse des prélèvements
- Isolement des souches
- Identification du genre et de l'espèce
- Etude de la sensibilité aux antibiotiques
- Collecte et analyse des données

Nous avons également travaillé sur des souches conservées. Ces souches ont été repiqués sur gélose nutritive afin de pouvoir réaliser les étapes l'analyse cyto bactériologique.

3.2. Analyse des prélèvements

Il s'agit de l'examen cyto bactériologique (ECB) selon les techniques usuelles de laboratoires représentées brièvement dans le schéma suivant :

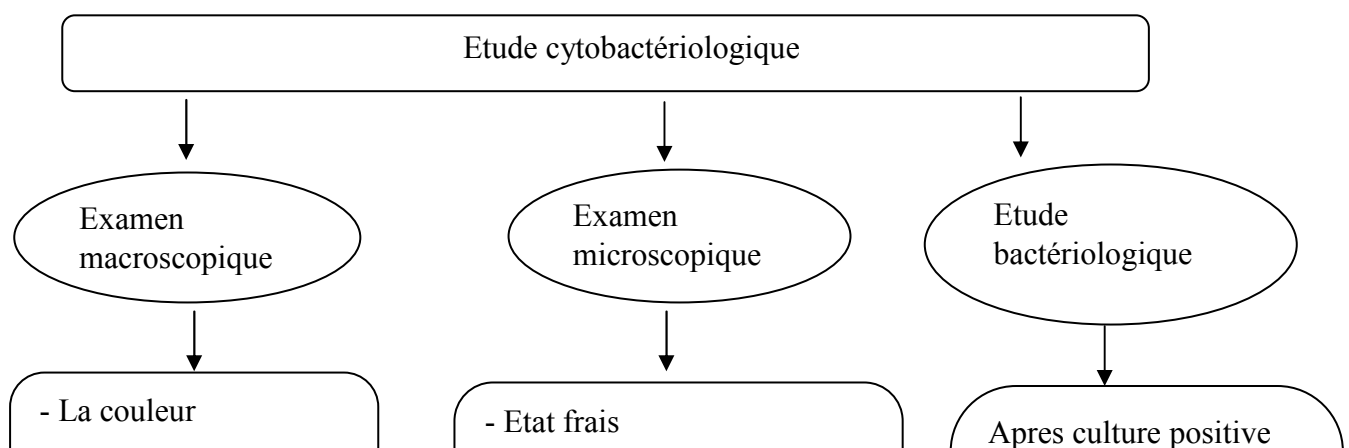


Figure 13 : Etapes d'une étude cyto bactériologique d'un prélèvement.

3.2.1. Examen microscopique

Il nous oriente sur la morphologie, la mobilité des bactéries vivantes ainsi que sur différentes numérations (polynucléaires, hématies, bactéries, les cristaux et d'autres cellules...).

a) Etat frais

Principe

Il nous oriente sur la morphologie, la mobilité et le mode de groupement. Il permet d'évaluer la quantité des bactéries en absence de toute fixation ou coloration et sur la présence de leucocyte, hématies et de levures.

Technique

Cet examen se pratique à partir du prélèvement. On dépose sur une lame propre et stérile une goutte prélèvement, ceci à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ; on recouvre la lame par une lamelle, puis observer au microscope optique au grossissement ($\times 400$).

Les *Acinetobacterbaumannii* apparaissent sur les lames de produits pathologiques à l'état frais comme coccobacille parfois entourés de capsule, non sporulés et immobiles.

En culture, l'aspect bacillaire est habituellement plus marqué à partir de milieux liquides.

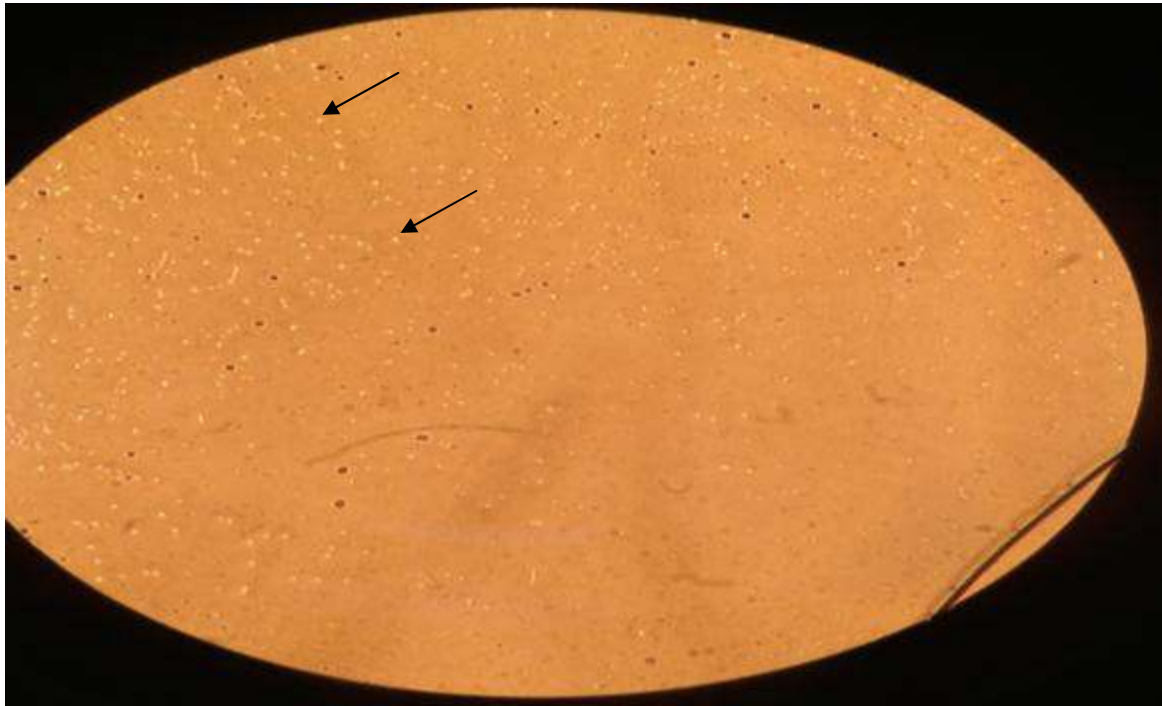


Figure 14 (originale) : aspect microscopique de *Acinetobacterbaumannii* à l'état frais. Les flèches indiquent les cellules individualisées de *Acinetobacterbaumannii* ($\times 400$).

b) Coloration au bleu de méthylène

Principe

C'est une coloration simple et rapide qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries et les détails pouvant échapper lors d'un examen à l'état frais (présence de spores, le regroupement cellulaire...). Sur le plan pratique, cette technique a peu d'échecs, mais elle ne permet pas de différencier les bactéries ayant une même morphologie.

Technique

Elle est réalisée suivant les étapes suivantes :

- Réaliser un frottis, le sécher et le fixer ;
- Recouvrir la lame par le bleu de méthylène ;
- Laisser agir pendant dix minutes ;
- Laver à l'eau de robinet, puis sécher ;

- Ajouter une goutte d'huile d'immersion puis observer au microscope au grossissement ($\times 1000$).

Nous observons que les structures apparaissent colorées au bleu (bactéries, polynucléaire).

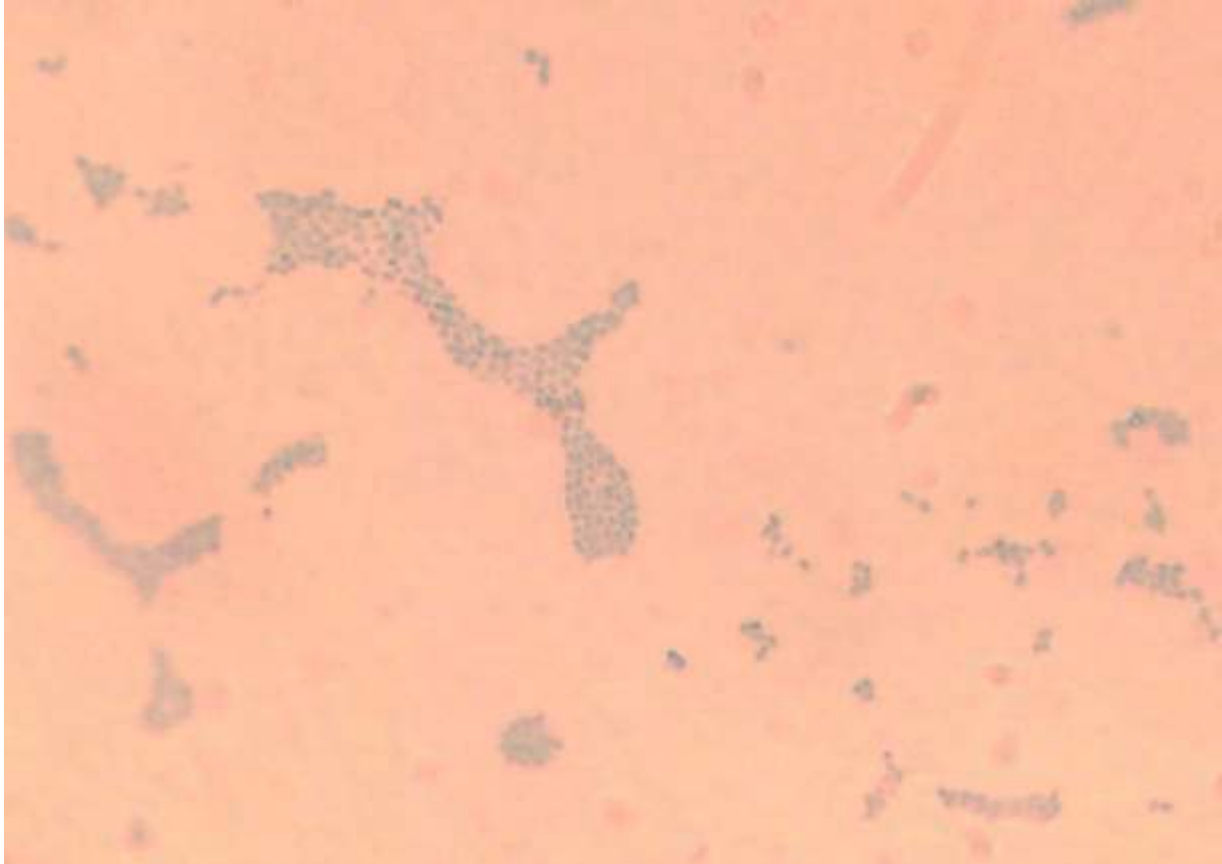


Figure 15 (originale) :Aspect de *Acinetobacterbaumannii* après coloration au bleu de méthylène ($\times 1000$).

c) Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne.

Elle permet de renseigner sur :

- Le type Gram + ou Gram -
- la forme des bactéries
- la taille

- le mode de regroupement

Technique

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement à l'eau distillée
- Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

Après coloration de Gram *Acinetobacterbaumannii* apparaît sous l'aspect de bacilles ou coccobacilles Gram négatif à variable.

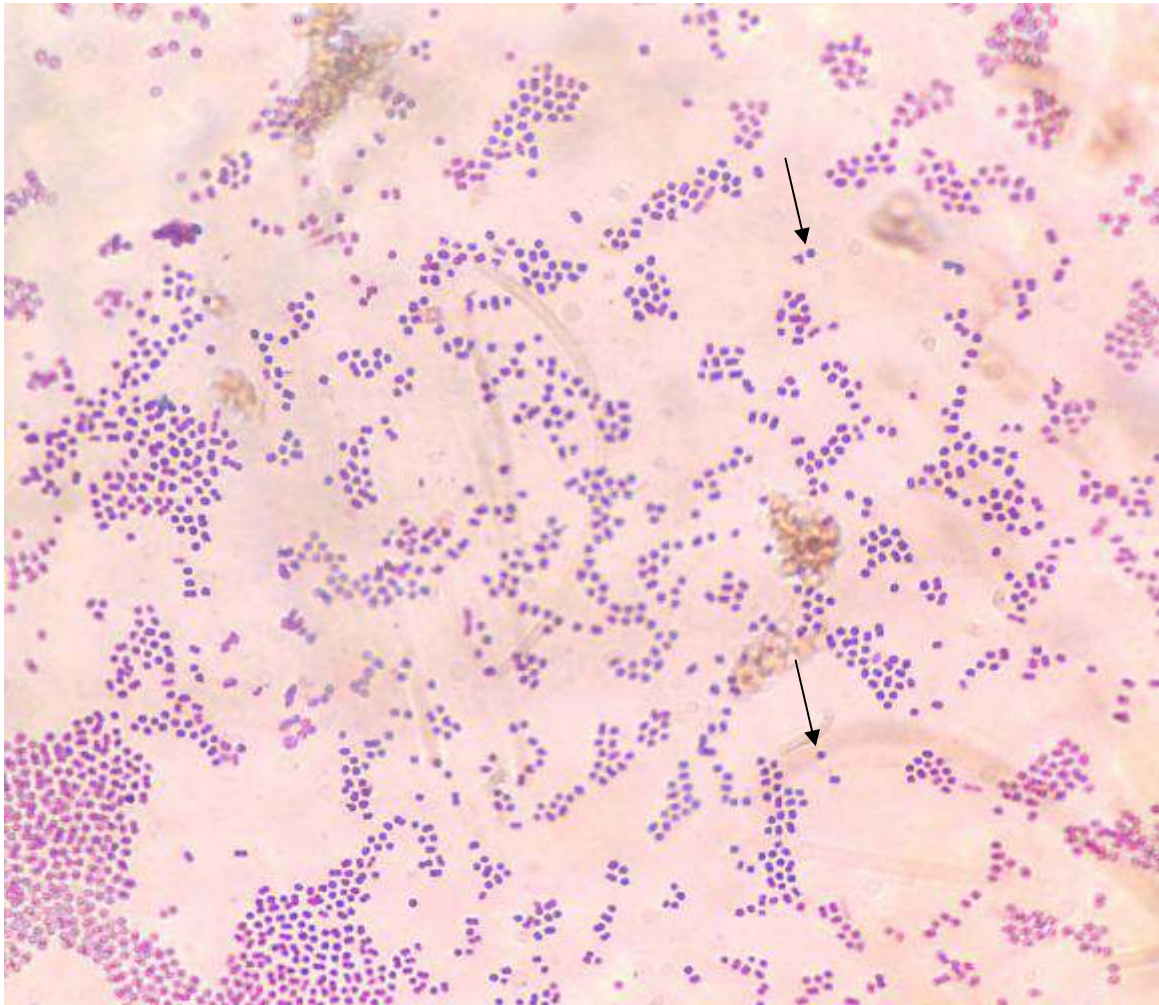


Figure 16 (originale) :Observation de *Acinetobacterbaumannii* au microscope optique après coloration de Gram, les flèches indiquent les cellules individualisées de *A. baumannii* ($\times 1000$).

3.2.2. Isolement des souches d'*A. baumannii* sur les milieux de cultures appropriés

Acinetobacterbaumannii est une bactérie non exigeante, qui pousse facilement sur gélose nutritive, gélose BCP, gélose au sang.

Les souches conservées ont été repiquées sur gélose nutritive.

Les colonies apparaissent sous l'aspect arrondies, lisses bords réguliers, de 2-3 mm de diamètre

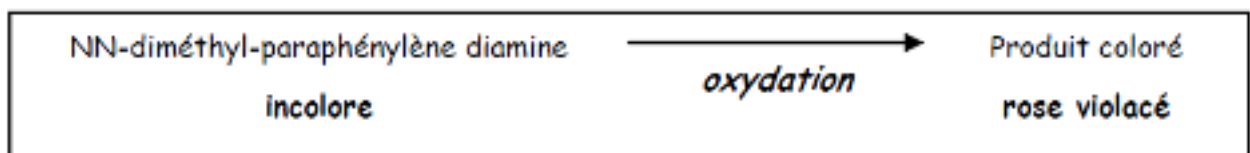


Figure 17 (originale) : Observation macroscopique après culture de 24 h des souches *Acinetobacter baumannii* sur milieu GN.

3.2.3. Oxydase

Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



Technique

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,

- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque





Remarque :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

Lecture et interprétation

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase + 	Oxydase - 

Le test à l'oxydase se révèle être négatif pour les souches *A. baumannii*.

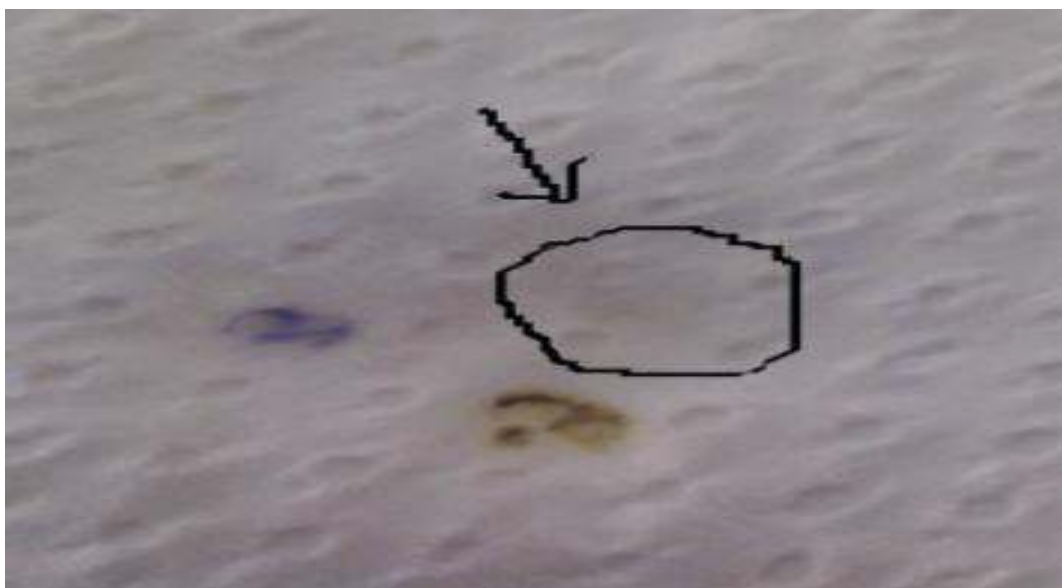
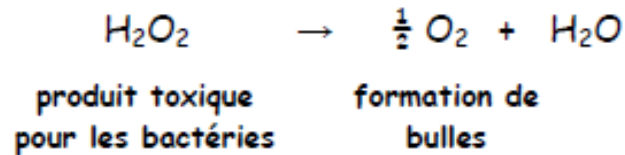


Figure 18 (originale) :Résultat du test à l'oxydase (la zone entourée) des souches *Acinetobacterbaumannii*.

3.2.4. Catalase

Principe

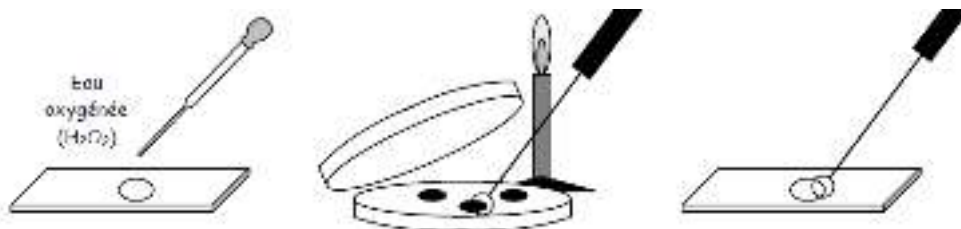
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



Technique

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse
- Dissocier la colonie dans la goutte



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

Lecture et interprétation

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase +	Catalase -
	

Le test de catalase est positif pour *Acinetobacterbaumannii*.



Figure 19 (originale) : Résultat du test à la catalase des souches *Acinetobacterbaumannii*.

3.2.5. Identification du genre et de l'espèce

Diagnostic du genre

En général, il est aisé d'identifier un bacille à gram négatif coccoïde au niveau du genre *Acinetobacter* par le cumul des caractères aérobies strict, l'absence de nitrate réductase, la réaction à l'oxydase négative, l'absence de mobilité.

Diagnostic de l'espèce

L'identification des diverses espèces est difficile. En pratique l'identification repose sur les galeries d'identifications commercialisés (API 20 NE®.) et parfois (API 20 E).

3.2.6. La galerie Api 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux, combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

Lecture et interprétation

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.
- Test NO₃ :
 - Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
 - Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
 - Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

- Test TRP :

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

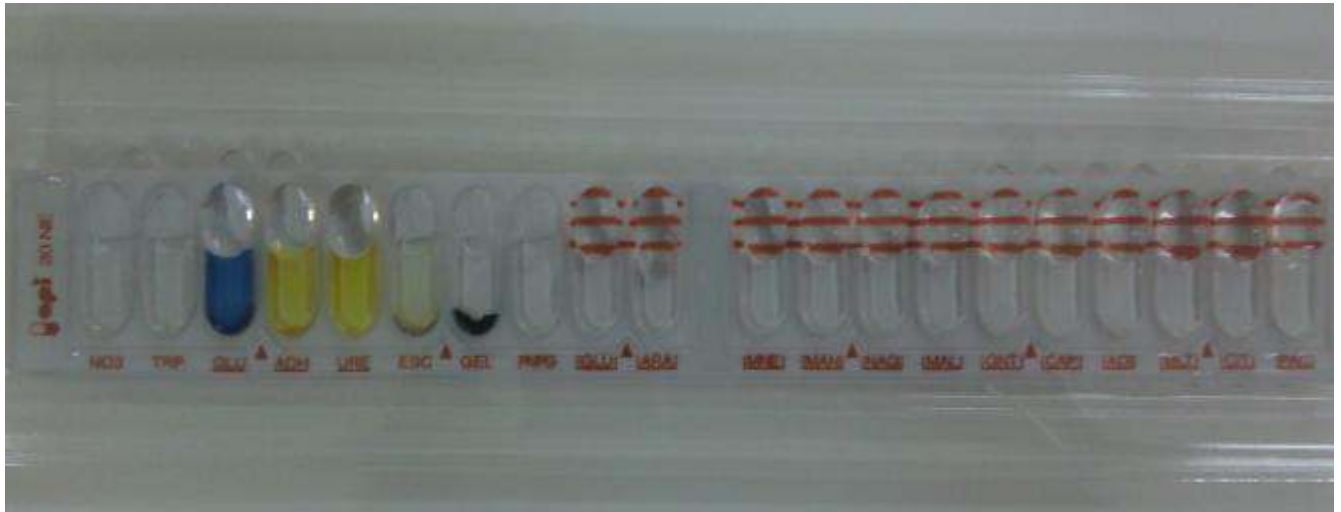


Figure 20 (originale) : Identification biochimique des souches *Acinetobacterbaumanniisurgalerie* Api 20 NE.

3.2.7. La galerie Api 20 E

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSIPette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.
- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIPette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :
 - pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,
 - pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
 - pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

Lecture et interprétation

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :
 - Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.
 - Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :
 - Réincuber la galerie 24 heures (\pm 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
 - Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).
 - Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

- Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)

* à l'aide du logiciel d'identification apiweb TM :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à

7 chiffres.

Tests	OX	CAT	GLU	LAC	ARA	SOR	CIT	LDC	ODC	GEL	URE	□GT
Résultats	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-



Figure 21 (originale) : Identification biochimique des souches *Acinetobacterbaumanniis* sur galerie Api 20 E.

3.2.8. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques selon les normes du CLSI

3.2.8.1. Antibiogramme

- Milieu Mueller-Hinton (MH) pour antibiogramme
 - Il doit être coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm
 - Les géloses doivent être séchées avant l'emploi
 - Préparation de l'inoculum
 - A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
 - Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.
 - Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.
 - Ensemencement
 - Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
 - L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Application des disques d'antibiotiques

- Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

- Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces bactériologiques stériles et ne pas déplacer les disques après application.

- Conditions d'incubation

18 heures à 35°C. Atmosphère ordinaire

- Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton simple, les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Petri fermée.

- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

Classer la bactérie dans l'une des catégories S (sensible), R (résistant) ou I (intermédiaire).



Figure 22 (originale) :Aspect de zones d'inhibition des disques d'antibiotique pour une souche *Acinetobacter baumannii*.

3.2.8.2. Contrôle de qualité de l'antibiotique

Pour chaque espèce bactérienne testée, un contrôle de qualité est réalisé dans les mêmes conditions de test et d'incubation.

- Objectifs

Rappelons que le contrôle de qualité permet de garantir :

- La précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité.
- La performance des réactifs utilisés dans les tests.
- La performance du personnel qui effectue les tests et la lecture.

Afin de se conformer à ces exigences, la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 va être utilisée :

- Procédure de contrôle

- Le contrôle de qualité doit se faire à chaque nouveau lot de Mueller-Hinton et ou d'antibiotiques. Ce travail de contrôle doit être permanent.

Il est conseillé de désigner dans chaque laboratoire une personne chargée de la supervision du contrôle de qualité.

Une traçabilité des disques antibiotiques doit être réalisée à l'aide des numéros de lots.

- La souche de référence devant être obligatoirement testée est :

P. aeruginosa ATCC 27853

- Une fois par semaine, cette souche sera testée, dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites pour les bactéries isolées.

Toutefois d'autres souches peuvent être intégrées dans le système de contrôle, leur choix est laissé à l'appréciation du microbiologiste et doit tenir compte du type d'antibiogramme pratiqué.

- Faire une analyse mensuelle (analyse pouvant être faite par le logiciel Whonet), de l'ensemble des tests de contrôle de qualité, par molécule et par technicien. Si les résultats ne sont pas satisfaisants, il faudra contrôler chacun des paramètres suivants :

- La lecture et l'interprétation des diamètres des zones d'inhibition

- Le milieu de culture
 - L'inoculum
 - Les disques d'antibiotiques
 - Les souches de référence.
- Le contrôle de qualité doit être pratiqué par tous les techniciens et jamais par un seul.
- a. Lecture et interprétation
- La lecture de l'antibiogramme doit se faire à l'aide d'un pied à coulisse. Elle doit être précise :
- Pour éviter au maximum les erreurs de parallaxe en maintenant l'instrument de mesure perpendiculairement à l'axe optique.
 - Pour les MH au sang la lecture des diamètres se fait à l'intérieur des boîtes, sans toucher la gélose.
 - Pour les MH simples la lecture se fait à l'extérieur de la boîte.
- Il faut vérifier que les interprétations (S, I, R) correspondent bien aux diamètres mesurés.
- Les mesures des diamètres d'inhibition seront soigneusement prises, et comparées aux valeurs critiques.
- Il faut éviter les confusions entre les différentes tables de lecture.
- Les deux causes principales d'erreur sont : mauvais ensemencement (stries non serrées) et mauvaise mesure des diamètres.

Tableau 3 : Souches de contrôle de qualité de l'antibiogramme.

Microorganismes	Souche de référence ATCC
<i>Acinetobacterspp.</i>	<i>Pseudomonasaeruginosa ATCC 27853</i>

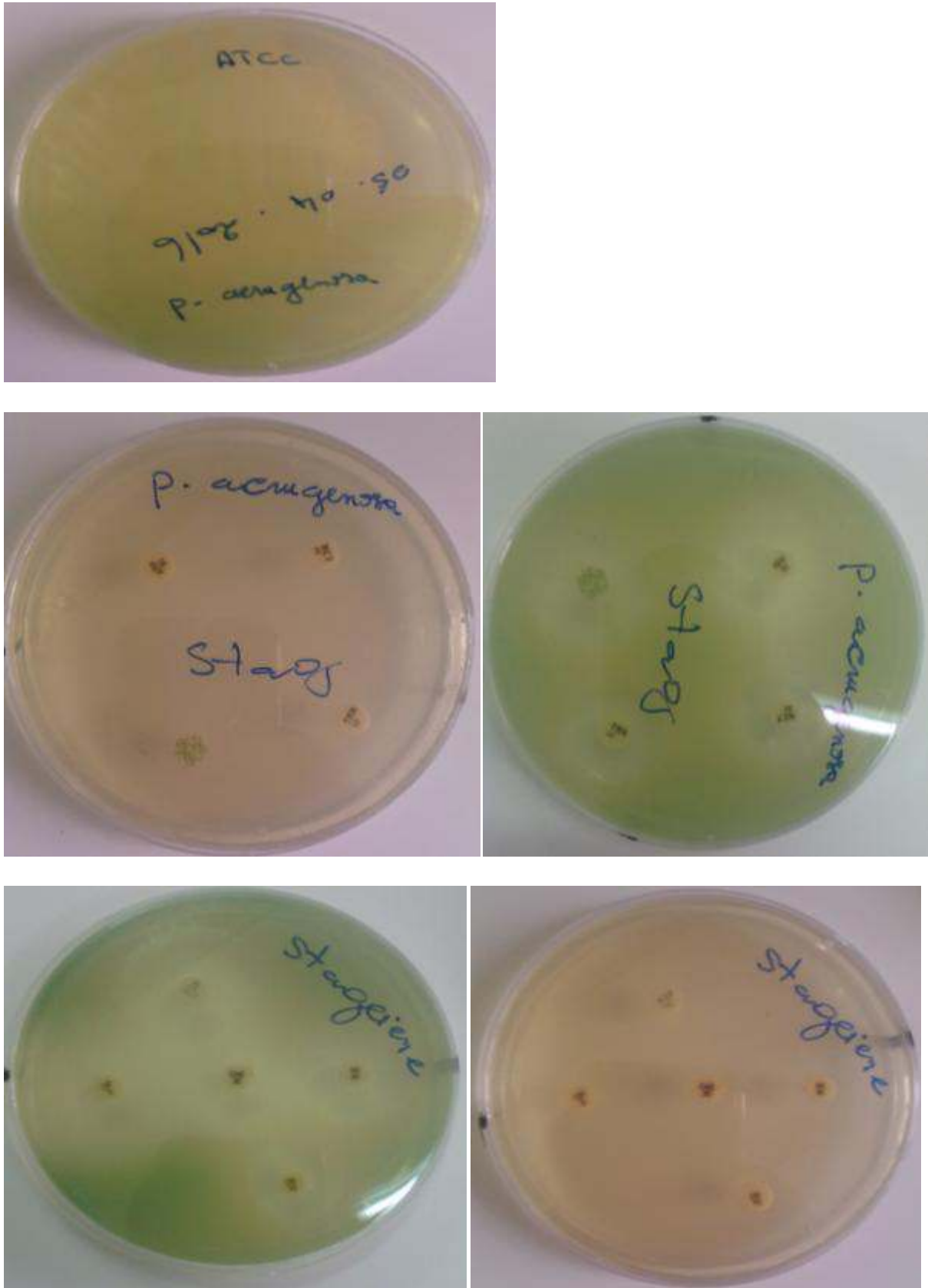


Figure 23 (originale) :contrôle de qualité de l'antibiogramme, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.2.8.3. Recherche de la BLSE

a) Définition d'une BLSE

Les BLSE désignent des enzymes produites par les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacterspp.* entraînant une diminution de l'activité des céphalosporines de 3ème génération (C3G) (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et des monobactames (aztréonam), mais n'ayant aucune activité vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, moxalactam) ni des carbapénèmes (imipénème).

b) Quand rechercher une BLSE

Selon les recommandations du CLSI (M100-S21), la recherche de la BLSE pour l'interprétation de la sensibilité de *Acinetobacterspp.* aux céphalosporines n'est plus obligatoire.

La détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

On recherchera une BLSE devant un diamètre inférieur aux valeurs suivantes :

- ceftazidime (CAZ à 22mm),
- aztréonam (ATM à 27mm).

c) Méthodes de détection de la BLSE

c.1 Test de synergie

Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam).

Pour *Acinetobacterspp.* la détection est plus difficile en raison d'association avec d'autres mécanismes de résistance tels : hyperproduction de céphalosporinase.

- Technique

La recherche de la BLSE se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme en déposant un disque de ticarcilline+acide clavulanique (TCC 75/10 μ g) à 30mm (centre à centre) d'un disque de C3G : ceftazidime (CAZ 30 μ g), aztréonam (ATM 30 μ g), céfépime (FEP 30 μ g).

- Incubation

Incuber 18 H à 35 °C

- Lecture

Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie ou « bouchon de champagne » entre les disques :

- TCC et CAZ

- TCC et ATM

- TCC et FEP

S'il y a absence de synergie, on peut rechercher la BLSE par :

- Le rapprochement des disques TCC et CAZ (15mm et 20mm centre à centre) au lieu de 30mm.

- La neutralisation de la Case : Si la souche est productrice d'une Case hyper produite, faire le test de synergie sur Mueller-Hinton additionné (de 250mg/l à 500 mg/l) de cloxaciline.

c.2 Test de confirmation ou technique du double disque

Ce test devra être fait systématiquement devant : L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G

- Technique

Ce test se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme.

- Appliquer les disques d'antibiotiques :

Pour *Acinetobacterspp.* :

Déposer un disque de TCC avec un disque de C3G (CAZ) ou monobactame (ATM) à une distance de 25mm.

Certains auteurs signalent une meilleure détection des BLSE en testant un disque de céfopérazone (75µg) avec un disque de TCC (75/10 µg).

- Laisser diffuser les antibiotiques pendant une heure, à la température ambiante (sur la paillasse), la boîte sera déposée couvercle vers le haut.

- Après 1 heure d'incubation, ôter le disque de TCC et le remplacer par un disque de CAZ.
- Incuber la boîte 18 H à 35°C.

- Lecture et interprétation

Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition autour du C3G, appliqué après diffusion du disque TCC est ≥ 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition autour du disque de C3G.

L'interprétation (R, I ou S) se fait selon les diamètres mesurés.

L'interprétation du test consiste à répondre :

Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés.

Il faut souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière.

3.3.8.4. Détermination de la CMI pour étude de la sensibilité à la colistine

a) Technique de dilution en gélose

a. Milieu de culture

- Milieu Mueller-Hinton en gélose
- Il est liquéfié par ébullition puis maintenu à la température de surfusion (45°C) jusqu'au moment de l'emploi.
- Il peut être supplémenté en sang frais ou autres en fonction des microorganismes testés

b. Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique

- Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique. Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).
- Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans le solvant approprié, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml.
- Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires. La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.
- Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.
- Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

c. Préparation de l'inoculum bactérien

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à $1-2 \cdot 10^8$ CFU/ml en moyenne. Utiliser l'eau physiologique (eau σ) à 0,9% pour la préparation de la suspension directe à partir d'une culture jeune de la bactérie à tester.
- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 10^4 CFU/ml par spots de 5 à 8 mm.
- Si on utilise un applicateur de 2µl par spot, diluer l'inoculum au 1/10ème en eau physiologique.
- Si on utilise un applicateur de 0,1 à 0,2µl par spot, ne pas diluer l'inoculum de départ (0,5 MF).

d. Dépôt des spots bactériens

- Déposer les spots dans les 15 mn suivant la préparation de l'inoculum.
- Marquer la boîte de dilution d'antibiotique pour localiser et identifier chaque spot.
- Appliquer chaque spot sur la gélose, une anse calibrée ou une pipette automatique à cône stérile.
- Commencer par la boîte témoin, puis déposer les spots sur les différentes boîtes en allant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Terminer en appliquant les spots sur une 2ème boîte témoin.
- Etaler une goutte de chaque souche testée, sur une gélose non sélective et incubé une nuit (détection des cultures mixtes, obtention d'une culture jeune).

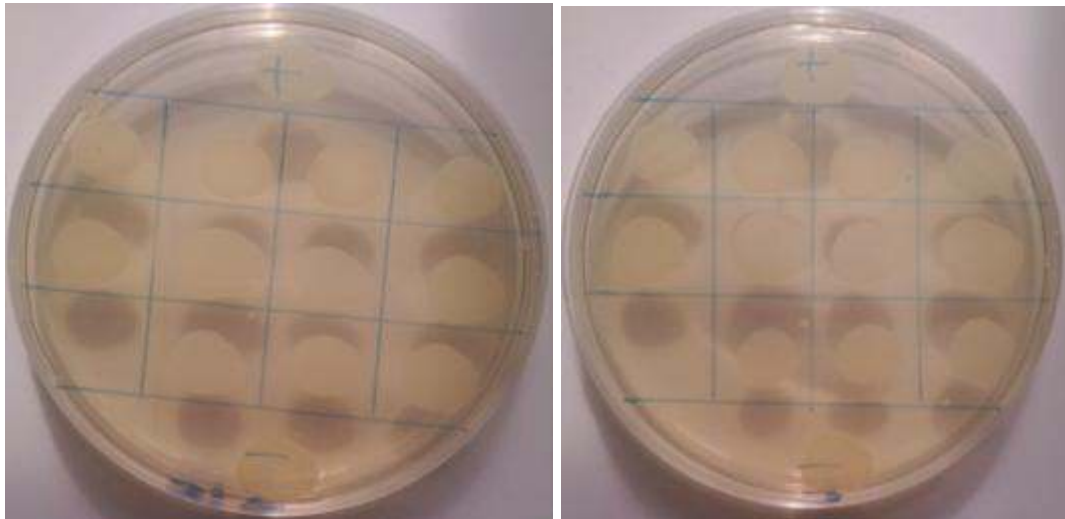


Figure 24 (originale) :Dépôt de spots bactériens pour la détermination du CMI par la technique de dilution en gélose.

e. Incubation

- Laisser les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, jusqu'à absorption de l'humidité (séchage des spots, pas plus de 30 mn).
- Renverser les boîtes et incuber à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ pendant 16-20 heures.
- Ne pas incuber en atmosphère à forte concentration de CO_2 , cela n'est pas recommandé (le CO_2 perturbe le pH du milieu).

f. Lecture des CMI

- Placer les boîtes sur une surface sombre, non réfléchive.
- Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).
- Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film
- Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

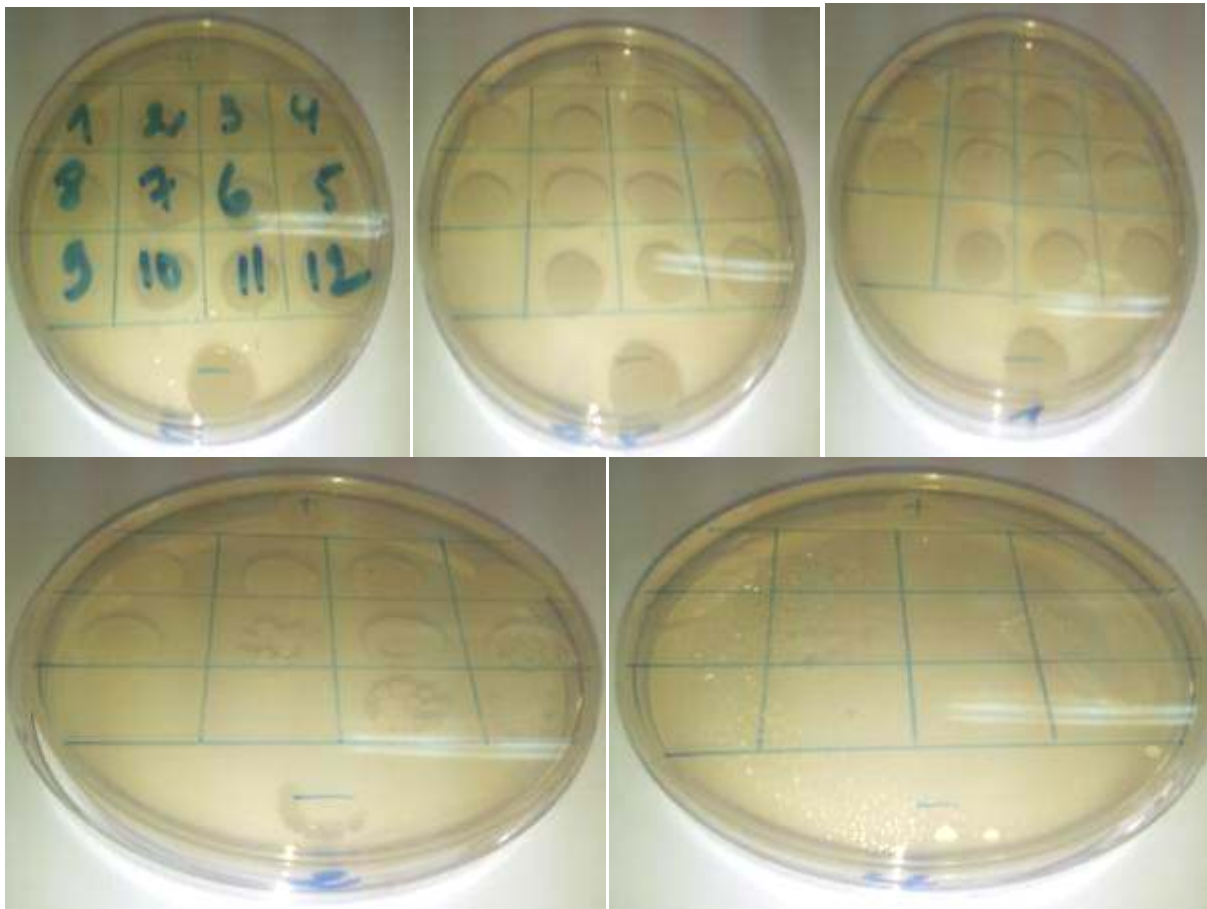


Figure 25 (originale) :lecture des CMI.

b) Technique du E-Test pour étude de la sensibilité à la colistine

C'est une technique de détermination de la CMI, validée pour les bactéries non exigeantes et pour un certain nombre de bactéries exigeantes.

1. Milieu Mueller-Hinton en gélose.

- Il doit être coulé en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4 mm
- Les géloses doivent être séchées avant l'emploi.

2. Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Bien décharger l'anse ou l'écouvillon dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

- Bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MF ou à une D.O. de 0,08 à 0,10 lue à 625 nm. Ajuster le plus précisément possible. L'utilisation d'un densitomètre est fortement souhaitable.

3. Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.

- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Ensemencer dans les mêmes conditions la (ou les) souche de référence.

4. Dépôt de la bandelette E-test

- Prélever la bandelette à l'aide de pinces bactériologiques préalablement flambées au bec Bunsen ; le contact avec les pinces doit se faire au niveau de l'extrémité marquée E ; à noter que l'utilisation d'un applicateur (à commander auprès du fournisseur de bandelettes E-test) est recommandée.

- Déposer la bandelette délicatement sur la surface gélosée, en commençant par l'extrémité correspondant aux concentrations les plus faibles de l'antibiotique testé puis en progressant jusqu'aux concentrations les plus élevées. Eviter la formation de bulles d'air entre la gélose et la bandelette, une fois appliquée la bandelette ne peut être déplacée.

- A noter que l'on ne peut déposer qu'une ou deux bandelettes E-test au maximum par boîte de 90 mm de \varnothing (risque de chevauchement des ellipses avec plus d'une bandelette).

- Laisser la boîte couvercle en haut pendant 15 mn au plus.

- Incuber la boîte à 37 °C, atmosphère ambiante.

5. Lecture et interprétation

- La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.
- Elle correspond à la graduation, située à la jonction entre l'ellipse (dessinée par l'inhibition de la culture bactérienne) et la bandelette E-test.
- Contrôler la qualité du test par la CMI de la souche de référence. Se référer au tableau de lecture fourni au niveau du prospectus E-Test.
- Lire ensuite la CMI de la souche bactérienne testée.
- Se référer aux recommandations du fournisseur pour l'interprétation de cas ambigus (double zone).
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.
- Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

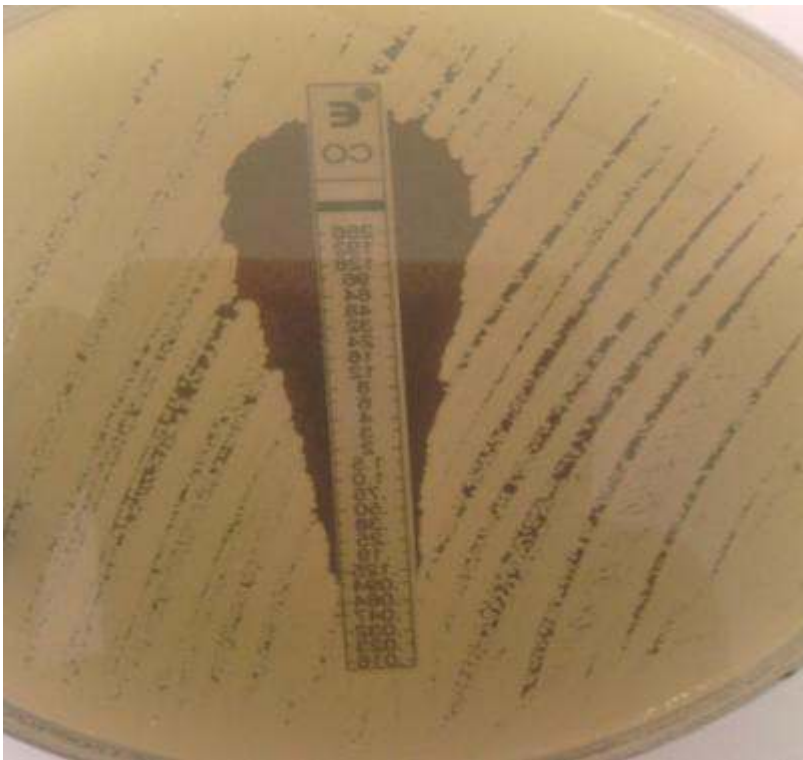


Figure 26 (originale) : Zone d'inhibition d'une bandelette à CMI pour une souche *Acinetobacterbaumannii*.

Tableau 4 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacterspp.*

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ticarcilline	75 µg	14	15 – 19	20	128	32-64	16	Le disque de TCC doit être placé à côté du disque de CAZ. Une synergie entre les 2 disques indique la présence d'une BLSE.
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	15 - 19	20	128/2	32/2-64/2	16/2	
Pipéracilline	100 µg	17	18 – 20	21	128	32-64	16	
Céftazidime	30 µg	14	15 – 17	18	32	16	8	
Imipénème	10 µg	13	14 – 15	16	16	8	4	
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16	
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4	
Tobramycine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4	
Nétilmicine	CMI	----	-----	-----	32	16	8	
Ciprofloxacine	5µg	15	16 – 20	21	4	2	1	
Lévofloxacine	5µg	13	14 – 16	17	8	4	2	
Doxycycline	30µg	9	10 – 12	13	16	8	4	Si résistance à doxycycline, réponse valable pour Tétracycline
Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	10	11 – 15	16	4/76	-----	2/38	
Colistine	-----	-----	-----	-----	> 2		2	La colistine est

								testée pour usage thérapeutique. Il faut déterminer la CMI.
Rifampicine**	30µg	14	14 – 18	19	> 16	16-8	4	Lecture valable pour <i>S.maltophilia</i> - Diluer l'inoculum 0,5 MF au 1/10ème Tester avec un inoculum 0,5MF dilué au 1/10 ^{ème}

* Tableau extrait du Document M100 – S21. Vol. 31, n°1. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement.

** Extraits des recommandations 2011 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

4. Collecte et analyse des résultats : grâce au logiciel Whonet 5.6

Les données ont été colligées avec le logiciel Whonet 5.6, et grâce au logiciel Excel nous les avons analysées.

Le WHONET est un logiciel élaboré pour la gestion et l'analyse des résultats d'analyses microbiologiques en laboratoire, qui se focalise principalement sur les résultats des tests de sensibilité aux antimicrobiens et a été adapté pour appuyer la mise en œuvre du Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (GLASS).

Caractéristique du logiciel :

- La saisie des données de l'information clinique et microbiologique sur les sites de surveillance.

- Exportation des statistiques dans le format requis pour la production de rapports locaux et nationaux.
- Analyse des résultats de laboratoire incluant les listings de ligne souche, les tests statistiques de la sensibilité aux antimicrobiens, des études de profils de résistance aux antibiotiques, et la détection d'épidémie à l'hôpital et en communauté.
- Lignes directrices intégrées d'interprétation de test de sensibilité pour la plupart des méthodes d'essai normalisées.
- Configuration modulaire permettant la personnalisation du logiciel pour clinique locale, la recherche, et les besoins épidémiologiques.
- Formats de structure de fichier de données simples et de sortie compatibles avec la base de données principale, un tableur, un logiciel statistique et traitement de texte.
- Rétrolien utilitaire de conversion de données pour faciliter le transfert des données des systèmes d'information des laboratoires en ligne sur WHONET évitant la nécessité d'une double saisie des données.
- WHONET fonctionne sur Microsoft Windows et à travers les émulateurs Windows, il peut être exécuté avec succès sur Linux et Mac OS X.
- Le logiciel est multilingue et est disponible dans plus de 20 langues

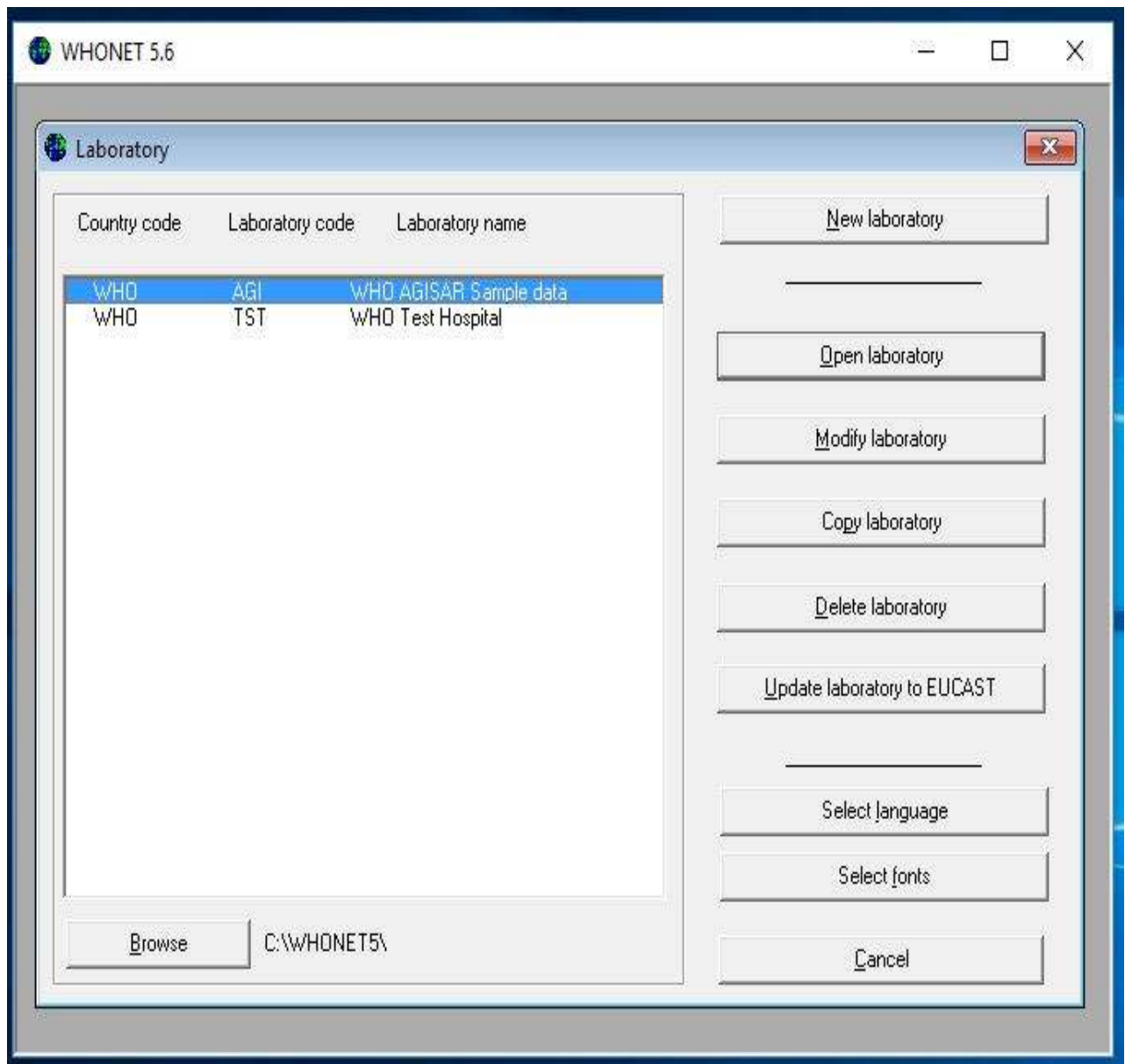
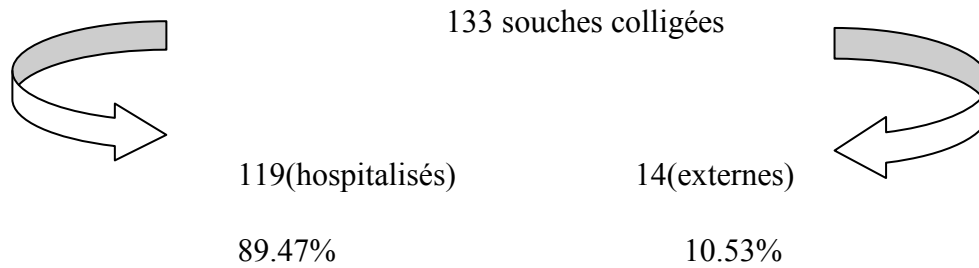


Figure 27 (originale) : Capture d'écran du logiciel Whonet 5.6.

Résultats et discussion

Nous avons collecté sur la période d'étude **133** souches *Acinetobacterbaumannii*,

119 provenaient de prélèvements issus de sujets hospitalisés et 14 de sujets consultant à titre externe comme vous pouvez le voir sur le diagramme suivant :



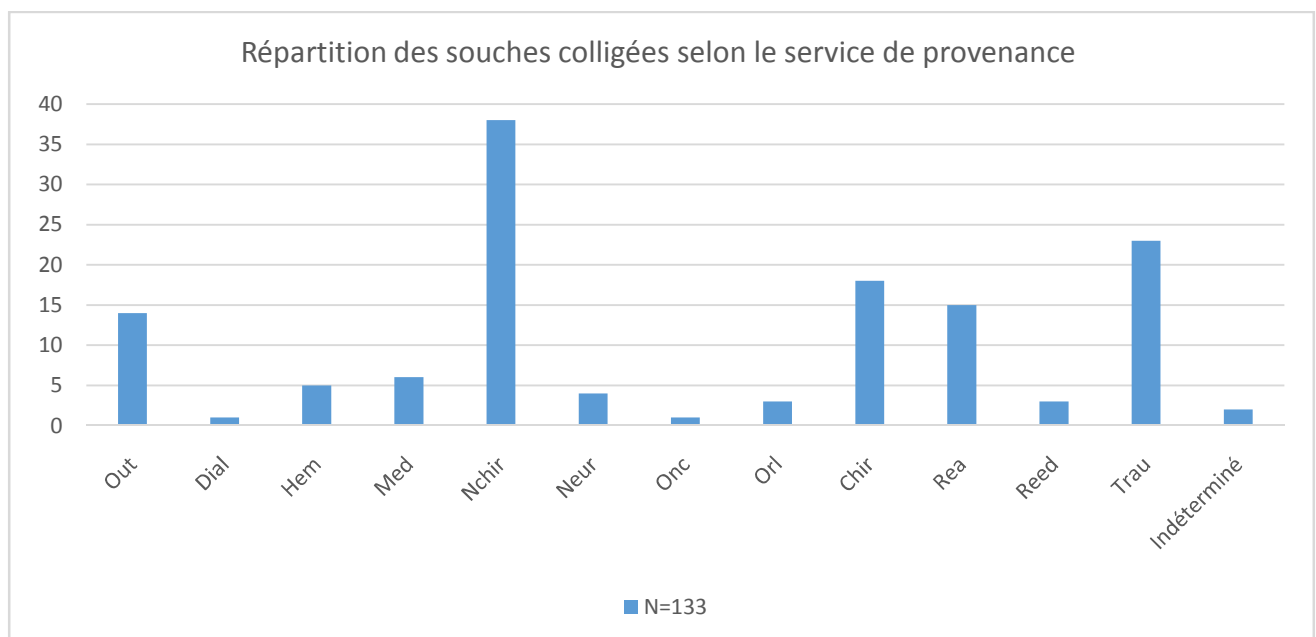
Nous nous sommes intéressés à la distribution des 133 souches selon :

- Le service de provenance et
- Le type de prélèvement dont elles sont issues

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux et diagrammes ci-après :

Tableau 5 : Répartition des souches colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéterminé
N=133	14	1	5	6	38	4	1	3	18	15	3	23	2
Total	133												

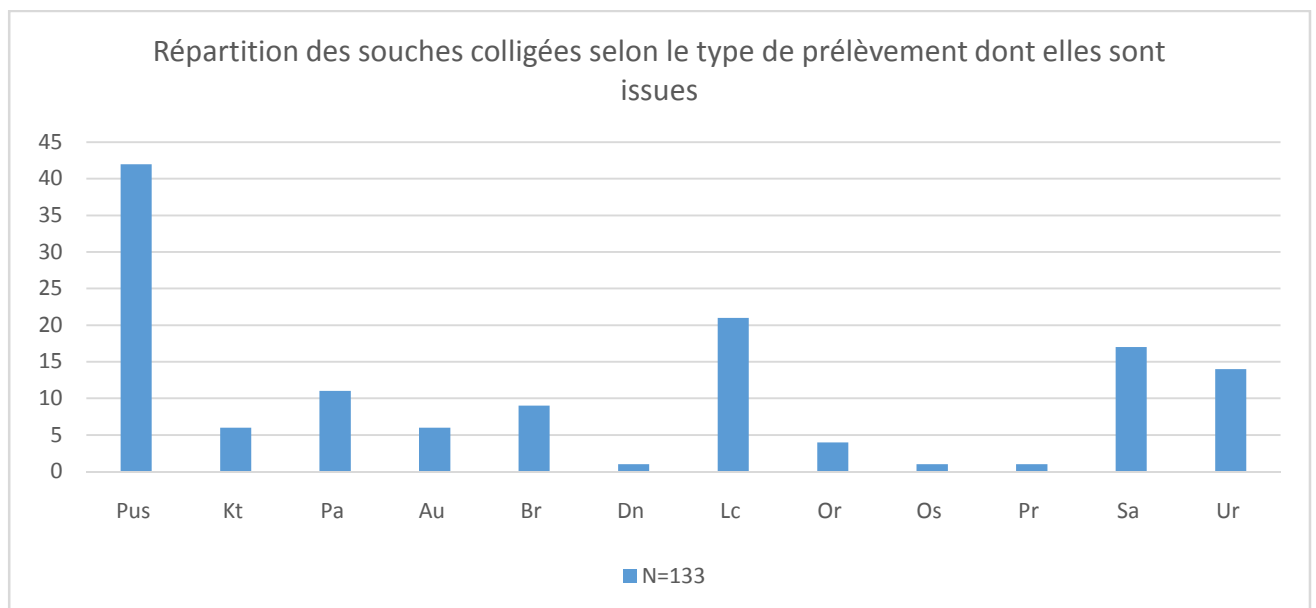


Services	Légendes
-----------------	-----------------

Out	Externe
Dial	Hémodialyse
Hem	Cac hémato
Med	Médecine interne
Nchir	Neurochirurgie
Neur	Neurologie
Onc	Cac Oncologie
Orl	Oto Rhino Laryngologie
Chir	Chirurgie
Rea	Réanimation
Reed	Rééducation
Trau	Traumato-orthopédie

Tableau 6 : Répartition des souches colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=133	42	6	11	6	9	1	21	4	1	1	17	14
Total	133											



Prélèvements	Légendes
Pus	Pus
Kt	Cathéter + cathéter central
Pa	Plaie
Au	Autres
Br	Bronchique
Dn	Drain
Lc	Liquide céphalo rachidien
Or	Oreille
Os	Os
Pr	Prothèse

Sa	Sang
Ur	Urine

On constate que la plupart des souches sont retrouvées dans le service neurochirurgie, et provenaient essentiellement du prélèvement de Pus.

Une souche d'*A. baumannii* est considérée comme BMR si elle présente les résistances suivantes :

La résistance à la Ceftazidime (CAZ) et/ou la Ciprofloxacine (CIP) et/ou l'Imipénème (IMP).

1. Souches *Acinetobacter baumannii* résistantes à la Ceftazidime (CAZ)

103 souches / 120 testées sont revenues résistantes à la ceftazidime, soit **un pourcentage de résistance égale à 85,8 %**.

Nous nous sommes intéressés à la répartition de ces souches selon le service et les prélèvements de provenance, voici les résultats :

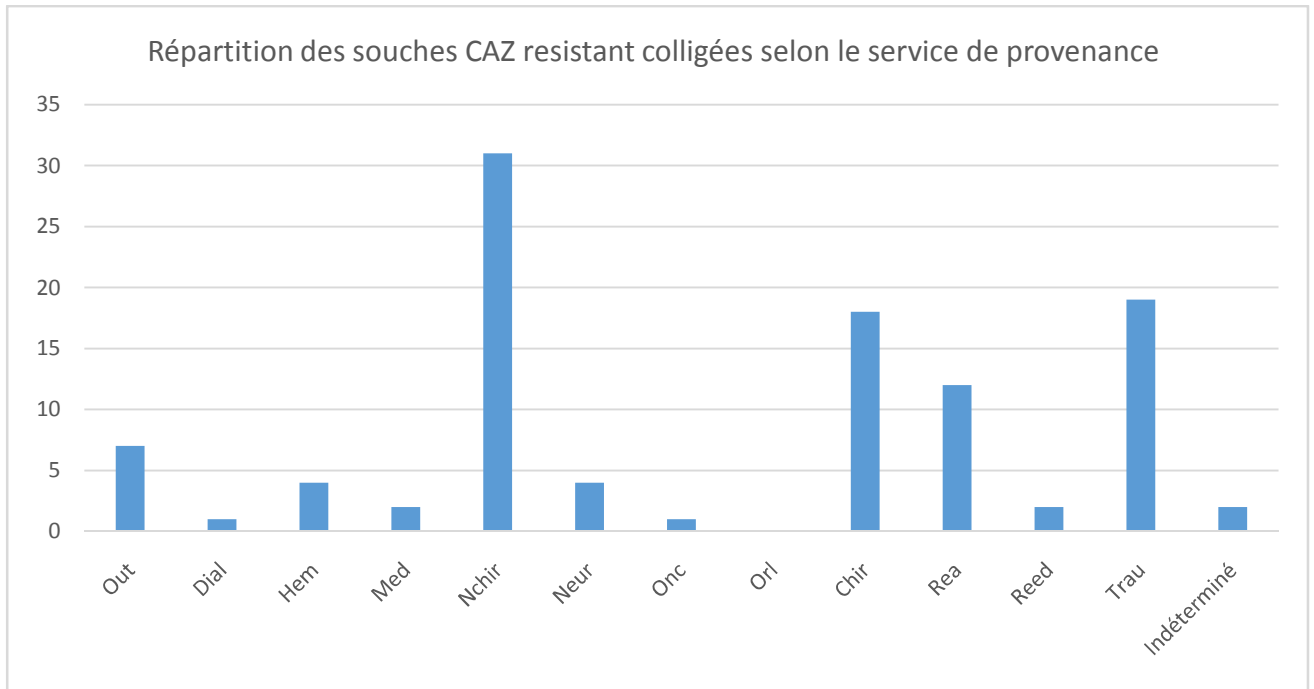
Tableau 7 : Répartition des souches CAZ résistant colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéter Miné
N=103	7	1	4	2	31	4	1	-	1	12	2	19	2
Total	103												

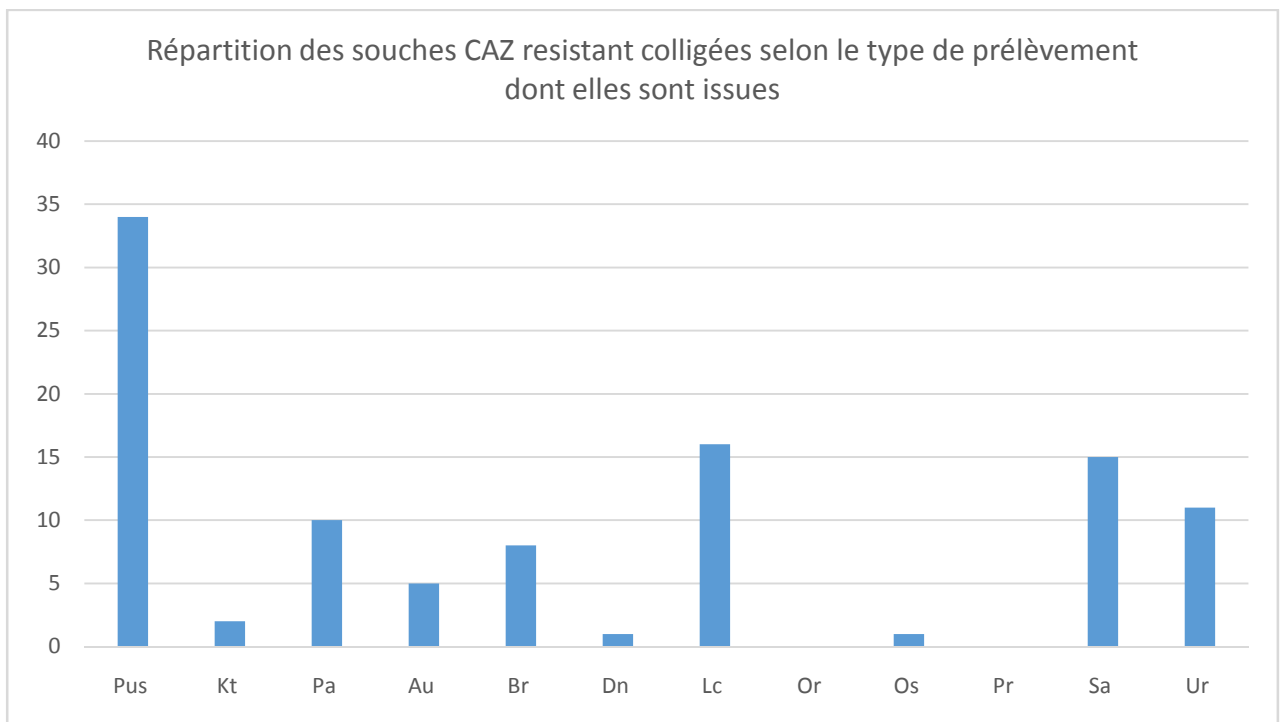
Tableau 8 : Répartition des souches CAZ résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=103	34	2	10	5	8	1	16	-	1	-	15	11
Total	103											

La plupart des souches CAZ résistant sont retrouvées en milieu hospitalier principalement au niveau du service **Neuro Chirurgie** comme le montre le diagramme suivants :



Le prélèvement dont proviennent la majorité des souches CAZ résistant est le pus, voir diagramme ci-après



2. Souches *Acinetobacterbaumannii* résistantes à la Ciprofloxacine (CIP)

La ciprofloxacine est un antibiotique appartenant à la famille des quinolones ; les Acinetobacter y sont généralement sensibles mais de plus en plus de souches acquièrent une résistance à cette molécule.

57 souches / 73 testées sont résistantes à la CIP soit un **taux de résistance égale à 78.08%**.

Les résultats de la répartition de ces souches résistantes selon le service de provenance et le type de prélèvements sont présentés dans les tableaux et diagrammes ci-dessus :

Tableau 9 : Répartition des souches CIP résistant colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéter Miné
N=57	3	1	2	-	14	3	-	-	12	8	1	12	1
Total	57												

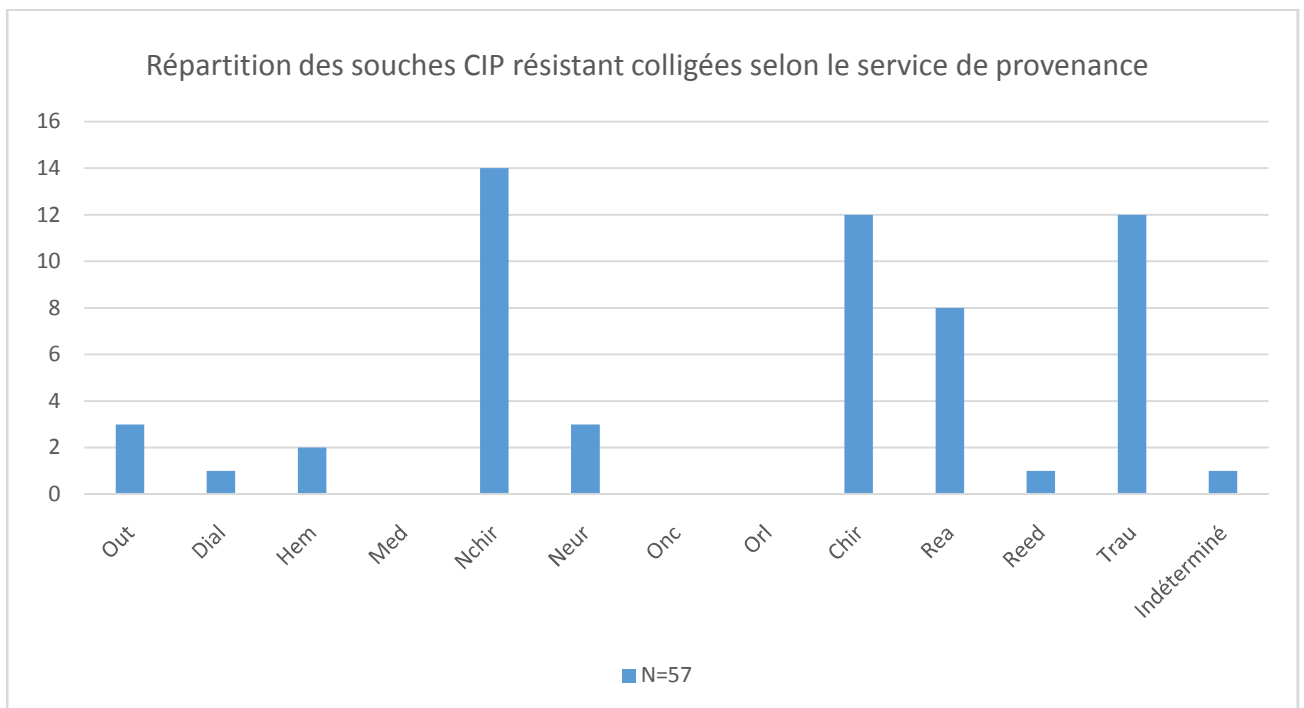
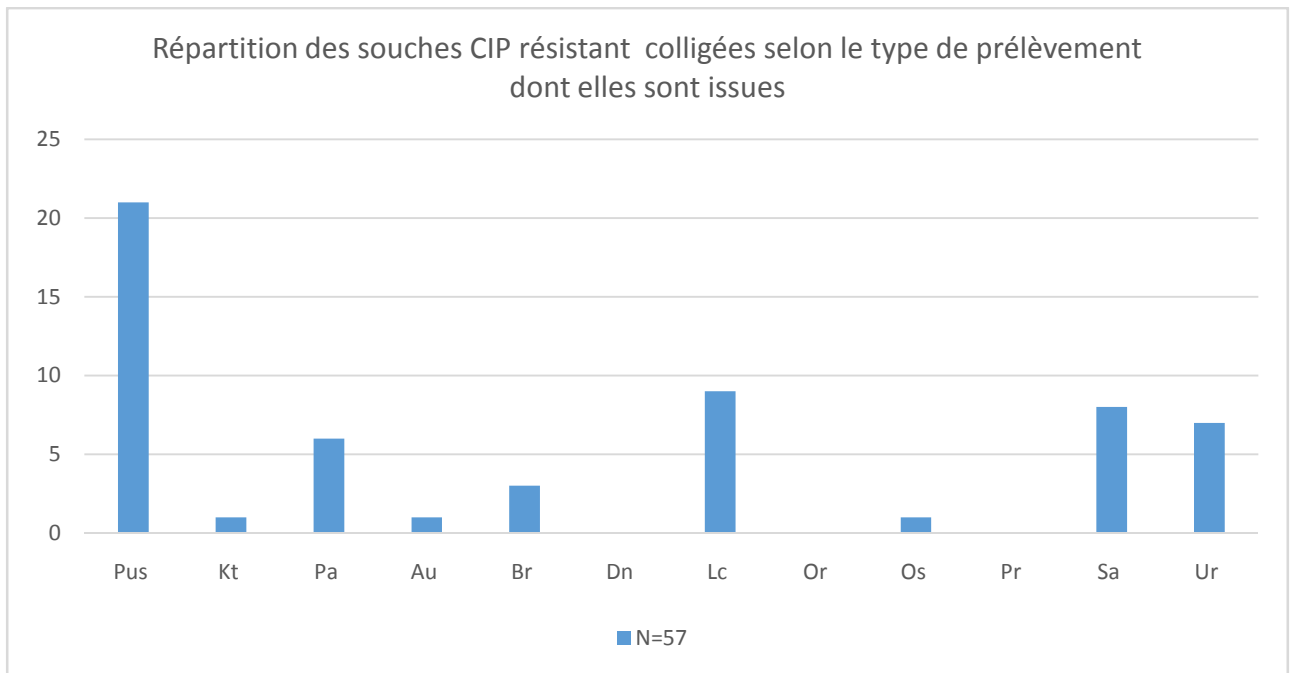


Tableau 10 : Répartition des souches CIP résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=57	21	1	6	1	3	-	9	-	1	-	8	7
Total	57											



Cette résistance est principalement constatée au sein du service de **neurochirurgie**.

La majorité des souches étaient issues du prélèvement de pus.

3. Souches *Acinetobacterbaumannii* résistantes à l'Imipenème(IMP)

L'imipenème est un antibiotique réservé normalement aux souches multirésistantes, lors de notre étude on a noté un taux de résistance de **57,2% soit 63 souches/ 110 testées**.

16 de ces souches (la majorité) est issue du service de **neurochirurgie**.

La plupart des *A. baumannii* résistants à imipenème sont retrouvés dans le prélèvement **Pus**.

Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux et diagrammes ci-bas :

Tableau 11 :Répartition des souches IMP résistant colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéter Miné
N=63	3	1	2	1	16	3	-	-	13	11	2	11	1
Total	63												

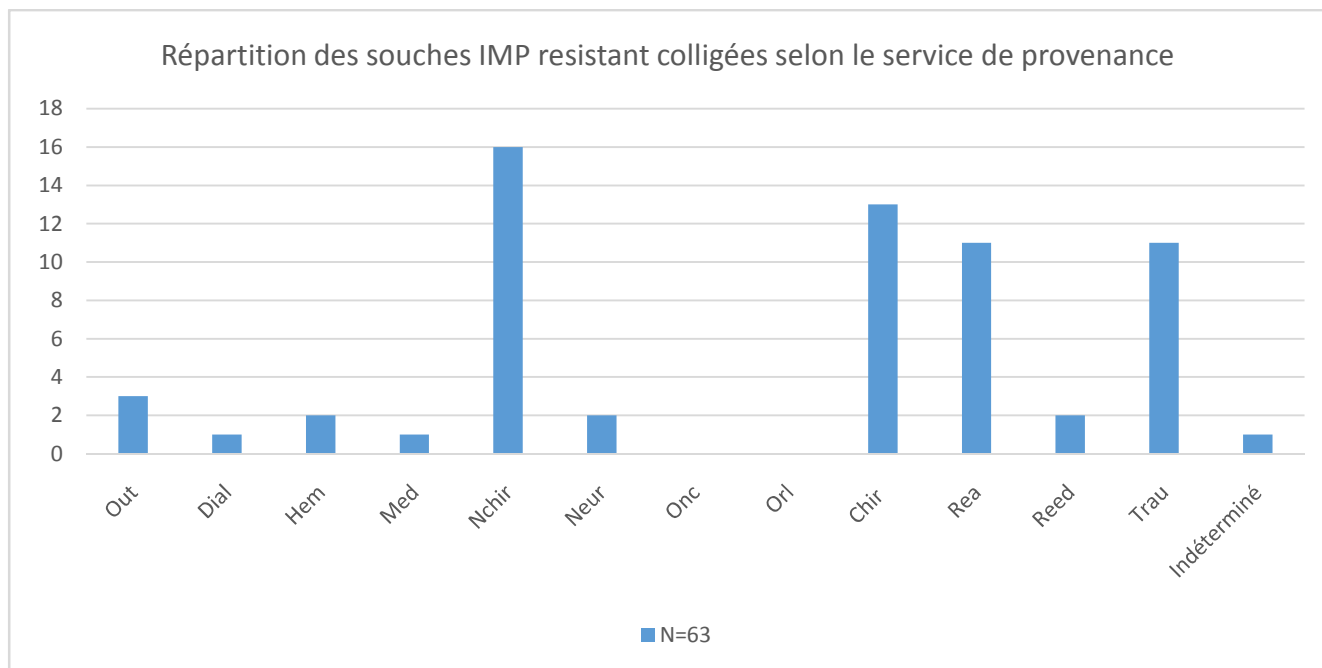
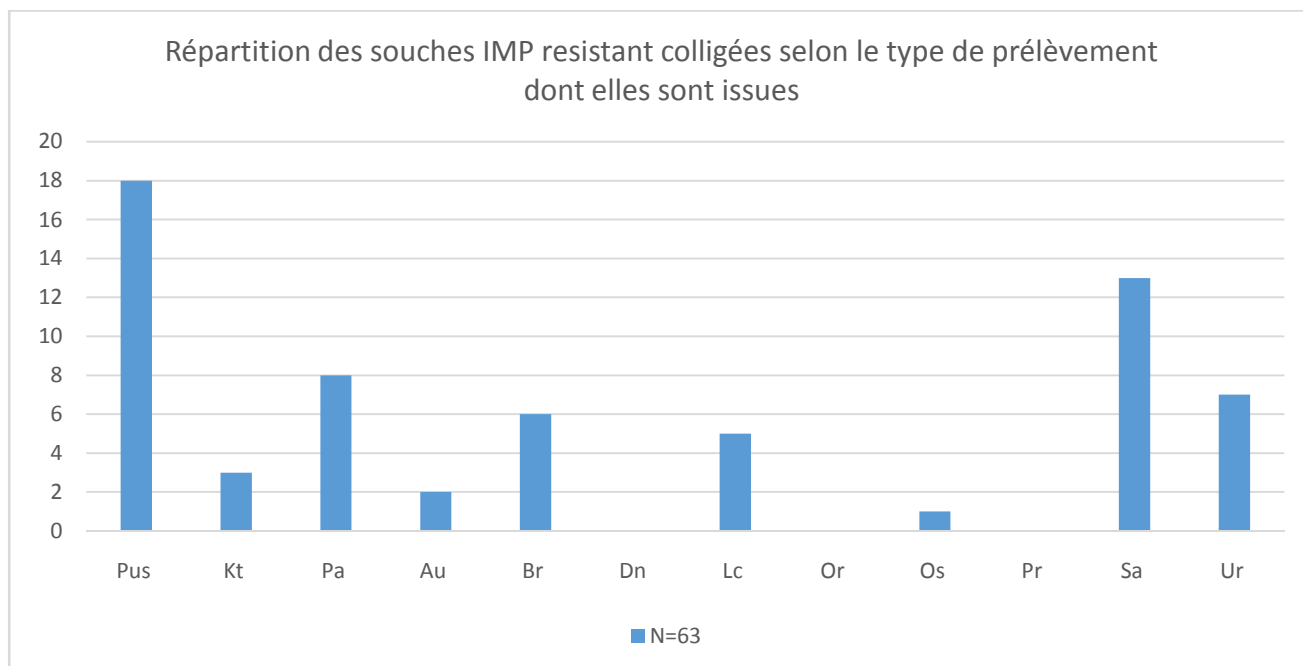


Tableau 12 : Répartition des souches IMP résistant colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=63	18	3	8	2	6	-	5	-	1	-	13	7
Total	63											



4. *Acinetobacterbaumannii* producteur de bêta lactamase à spectre élargi (BLSE+)

Un taux de production de la BLSE de **33.9%soit 39 souches / 115 testées.**

Le profil BLSE est principalement retrouvé dans les prélèvements de patients hospitalisés en **neurochirurgie.**

Le prélèvement dont on a isolé le plus de souches BLSE positif est le **Pus.**

Les résultats obtenus et présentés dans les tableaux et diagrammes ci-après :

Tableau 13 :Répartition des souches BLSE positif colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéter Miné
N=39	3	-	1	1	13	2	1	-	3	4	1	8	2
Total	39												

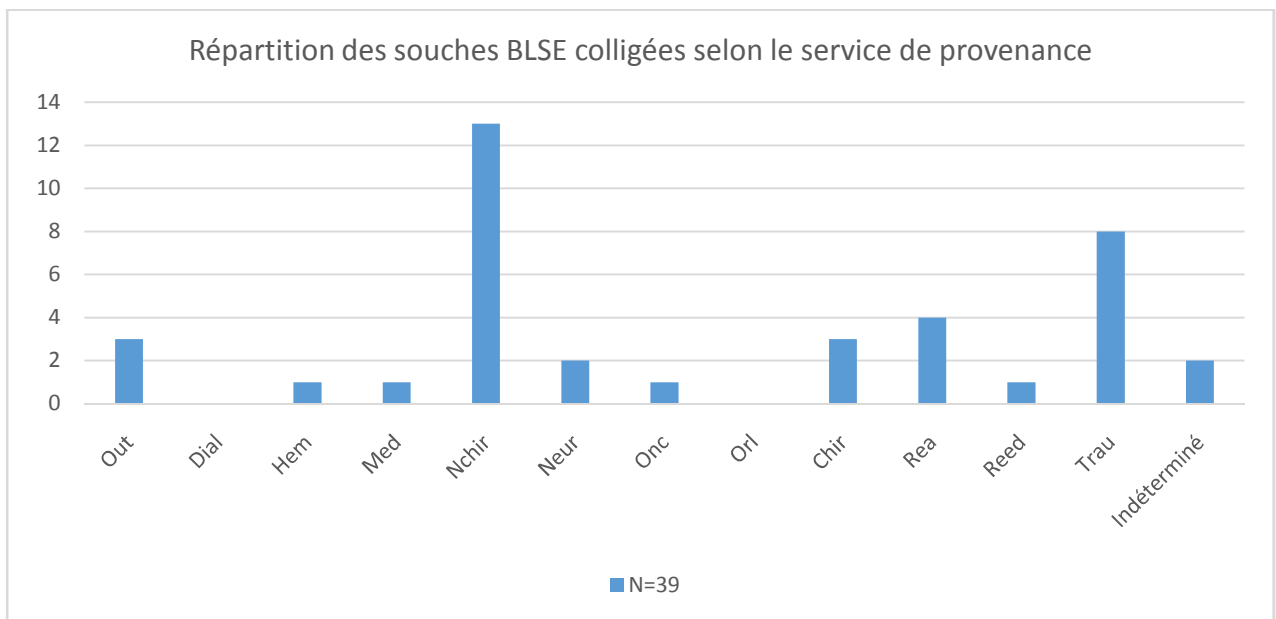
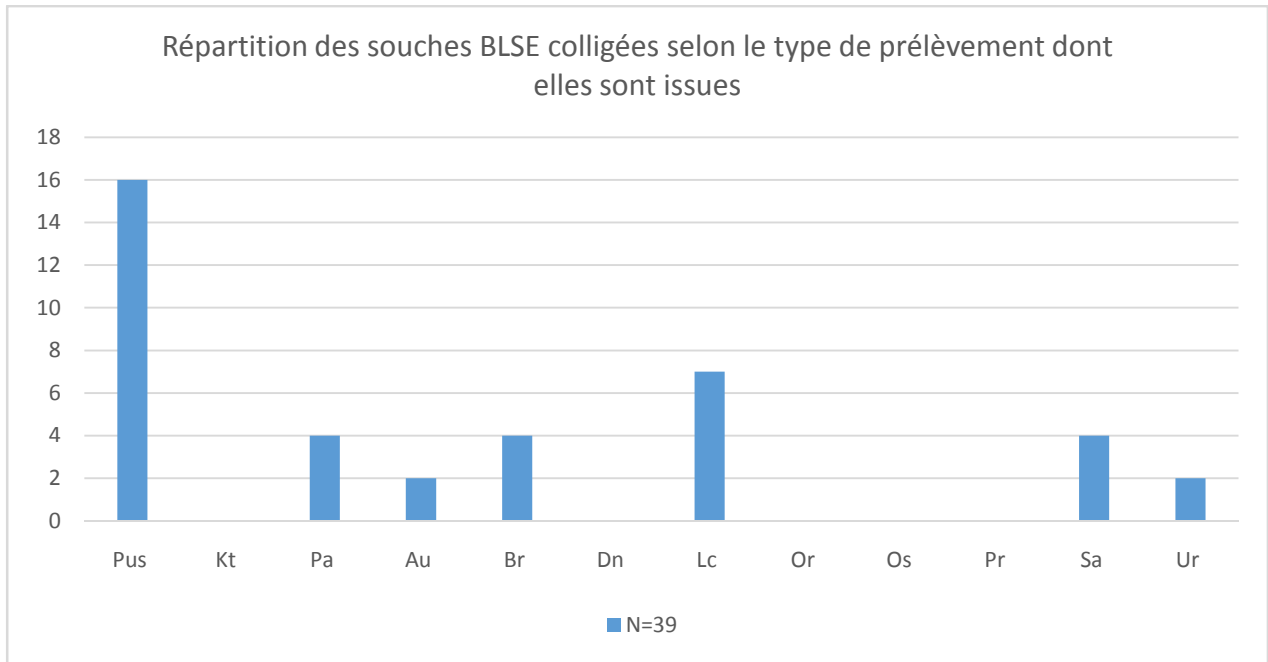


Tableau 14 :Répartition des souches BLSE positif colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=39	16	-	4	2	4	-	7	-	-	-	4	2
Total	39											



5. Souches *Acinetobacterbaumannii* résistantes à toutes les molécules testées.

Nous avons répertorié 25 souches résistantes à la ceftazidime, la ciprofloxacine, l'imipénème ainsi qu'à toutes les molécules testées.

5.1. Répartition des 25 souches par type de prélèvement et par service de provenance :

On constate que la plupart de ces souches proviennent du service de **Neurochirurgie** et elles sont isolées principalement d'**hémocultures**.

Tableau 15 : Répartition des 25 souches colligées selon le service de provenance.

Services	Externe	Interne											
	Out	Dial	Hem	Med	Nchir	Neur	Onc	Orl	Chir	Rea	Reed	Trau	Indéter Miné
N=25	2	-	-	-	8	-	-	-	3	7	-	2	3
Total	25												

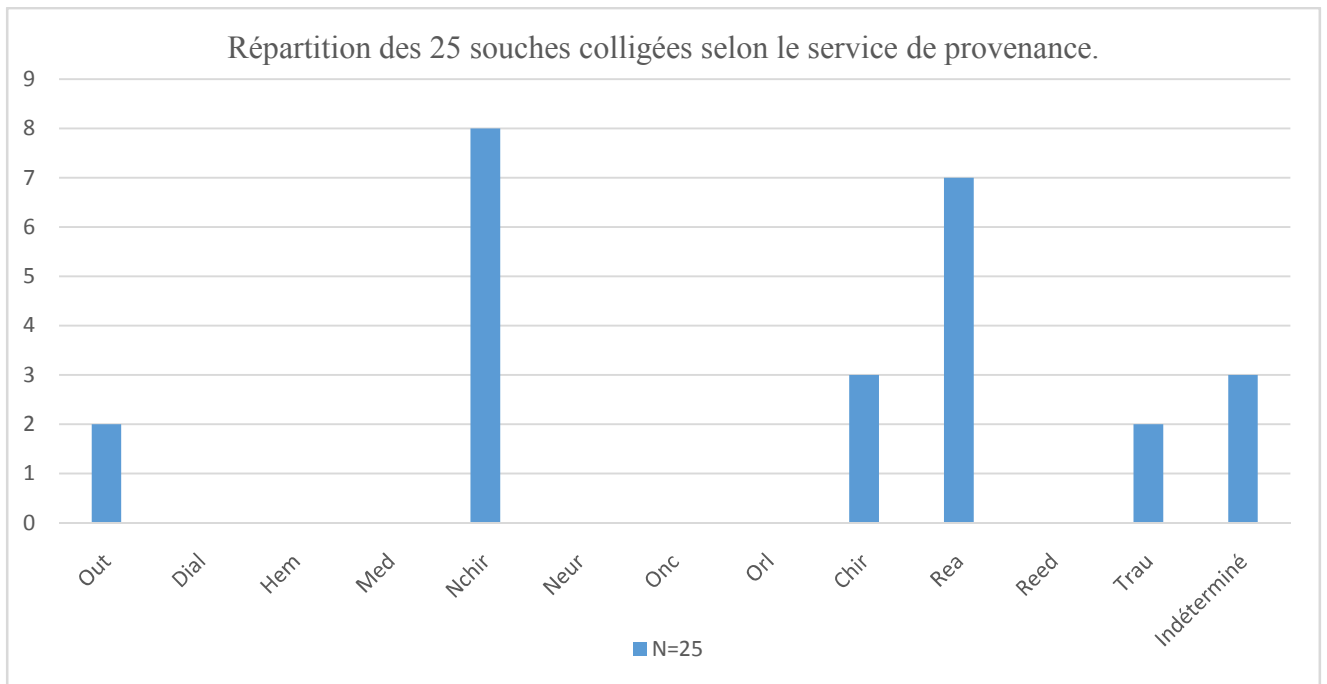
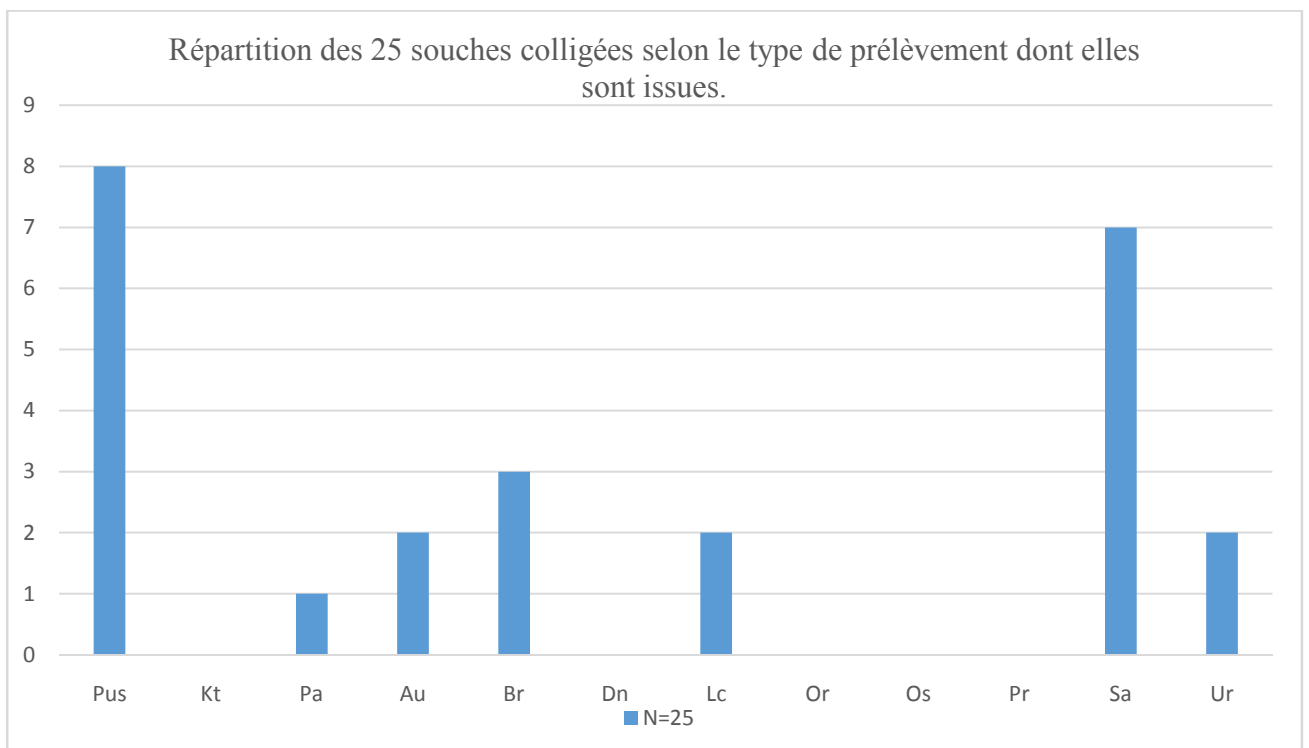


Tableau 16 :Répartition des souches pan-résistantes colligées selon le type de prélèvement dont elles sont issues.

Prélèvements	Pus	Kt	Pa	Au	Br	Dn	Lc	Or	Os	Pr	Sa	Ur
N=25	8	-	1	2	3	-	2	-	-	-	7	2
Total	25											



5.2. La colistine arme contre les souches résistantes à toutes molécules testées.

La colistine est présentée comme la seule arme thérapeutique possible devant lesdites souches. Nous avons étudié la sensibilité de ces souches pour cette molécule et ceci par la détermination de la CMI par technique de dilution en milieu solide.

Les 25 souches testées étaient toutes sensibles à la colistine.

6. Discussion

Notre étude a révélé un taux d'isolement assez conséquent des souches *Acinetobacterbaumannii* principalement en milieu hospitalier sachant que ce taux a été de 89.47% versus 10.53% en communautaire, cette constatation a été avancée par plusieurs études dont celle de **DraultJ.N. et al.**, en 2001 qui ont conclu que l'*Acinetobacterbaumannii* est fréquemment impliqué dans la survenue d'infections nosocomiales, et plus particulièrement dans les services de réanimation, la survenue d'infections communautaires à *A. baumannii* reste cependant exceptionnelle.

Selon notre étude les services les plus concernés par les infections à *A.baumannii* et *A.baumannimultirésistants* sont les services chirurgicaux, à leur tête, la neurochirurgie, ainsi que la réanimation. Cependant il faut savoir que le service de Neurochirurgie du CHU Blida est doté de son propre service de réanimation ; ainsi on pourrait avancer le fait que la bactérie étudiée est prédominante en réanimation, ce qui concorde avec les observations issues d'études similaires ; on citera l'étude de **Ait el kadi M. et al.**, menée à Rabat, Maroc en 2006, celle de **Ben Haj Khalifa A. et KhedherM.**, à l'hôpital Tahar Sfar de Mahdia durant la période (2006–2008) et de **ElouennassM. et al.**, dans une étude rétrospective réalisée durant la période du 30 juin 2000 au 30 juin 2001, au service de microbiologie de l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat Maroc (HMI Med V), ainsi que l'étude menée par **LahsouneM. et al.**, 2003 à décembre 2005 au laboratoire de microbiologie du CHU Ibn-Rochd, Casablanca, Maroc.

Cette fréquence au sein de la réanimation et des services chirurgicaux peut s'expliquer par le fait que les patients au sein de ces services sont des sujets qui passent une période prolongée à l'hôpital ; ce sont parfois des malades chroniques et/ou immunodéprimés présentant parfois des traumatismes multiples et dont la prise en charge nécessite une antibiothérapie parfois à large spectre à l'origine de sélection de résistance ; ils représentent de ce fait un groupe à risque élevé d'infection à *A. baumannii*.

Sans oublier que l'acte chirurgical lui-même est un facteur d'acquisition d'infection à germes hospitaliers.

Il faut savoir également que les patients au sein de ces services acquièrent des dispositifs artificiels tels que les valves de dérivation, cathéters, sutures, des ventilateurs sur lesquels *A. baumannii* a la capacité de former des biofilms.

Un fait tout aussi important doit être relevé, c'est le caractère épidémiogène de cette bactérie. Ainsi elle serait une des bactéries les plus difficiles à maîtriser dans un contexte épidémique.

Les plaies chirurgicales, le SNC, le sang, les voies respiratoires, le liquide pleural, les voies urinaires, la peau et les yeux peuvent être des sites d'infection ou colonisation par *A.baumannii*.

Selon nos résultats le prélèvement dont sont issues la plupart des souches est le pus ainsi que le liquide céphalorachidien et le sang ; ce qui revient à dire que cette bactérie a été à l'origine de suppurations, de méningites et de septicémies avec souvent un pronostic vital engagé. Ceci est en contradiction avec les données de la littérature (**Ben Haj Khalifa A., Khedher M., 2010**) ; (**Ait el kadia M., et al., 2006**) ;(**Elouennass M., et al., 2003**) ;(**Lahsoune M., et al., 2007**) qui place les prélèvements respiratoires en pole position, alors que dans notre cas c'est les suppurations. On pourrait avancer l'hypothèse qu'au CHU de Blida les infections à *A. baumannii* seraient plutôt des infections sur site opératoire.

Acinetobacterbaumanii est résistant à l'imipénème à la ceftazidime et à la ciprofloxacine grâce à sa capacité à "changer" sa structure génomique ; ce qui explique la rapidité avec laquelle il capture des marqueurs de résistance lorsqu'il est sous pression antibactérienne, comme cela peut se produire dans un environnement à haut risque, tel que les unités de soins intensifs où les antimicrobiens à large spectre sont couramment utilisés. (**Howard et al., 2012**).

Nous avons comparé les résultats de notre étude, sur la résistance à l'imipénème, à la ceftazidime et à la ciprofloxacine, avec les données des rapports 2013 et 2014 du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN). Il n'en ressort pas de différences significatives (tableau 17).

Nous n'observons pas de différences significatives entre nos résultats et les données du Réseau de surveillance chez les patients hospitalisés et les patients externes (tableau 18).

Tableau 17 :comparaison des résultats de notre étude avec les rapports AARN sur la résistance aux antibiotiques et le BLSE.

	Notre étude		Rapport 2013		Rapport 2014	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Ceftazidime	103 / 120	85,80	765/878	87.13	1114/1279	87.10
Ciprofloxacine	57 / 73	78.08	471/577	81.63	534/676	78.99
Imipenème	63/110	57.20	457/647	70.63	902/1164	77.49
BLSE positif	39/115	33.90	100/603	16.58	157/1163	13.50

Tableau 18 :comparaison des résultats de notre étude avec les rapports AARN sur la résistance aux antibiotiques chez les patients internes et externes.

	Notre étude				Rapport 2013				Rapport 2014			
	Interne		Externe		Interne		Externe		Interne		Externe	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
CAZ	96/108	88. 89	7/12	FE	739/834	88. 61	26/44	59.0 9	1082/121	88. 76	32/60	53. 33
CIP	54/67	80. 60	3/6	FE	456/555	82. 16	15/22	FE*	522/643	81. 18	12/33	36. 36
IMP	60/99	60. 60	3/11	FE	447/623	71. 75	10/24	FE	874/1107	78. 95	28/57	49. 12

*FE : faible effectif, nombres de souches testés inférieures à 30.

Dans un rapport appuyé par l'industrie de surveillance (MYSTIC) à partir de 48 hôpitaux européens pour la période 2002-2004, seulement 69,8% des isolats *A. baumannii* étaient sensibles à l'imipenème. La sensibilité à d'autres antibiotiques était également très faible, de 32,4%, et 47,6% étant sensible à la ceftazidime et la ciprofloxacine, respectivement. (Howard et al., 2012)

Il y'a une longue histoire d'infections à *A. baumannii* multirésistant survenus aux États-Unis. En 1991 et 1992, des foyers de résistance, des souches de *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes, ont été observés dans un hôpital à New York City. Cela faisait suite à une épidémie due aux *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE au cours de laquelle l'utilisation de l'imipenème a considérablement augmenté. (Howard et al., 2012)

Dans une étude de surveillance industrielle plus récente, concernant les isolats de *Acinetobacter* recueillies entre 2004 et 2005 à partir de 76 centres à travers les États-Unis, seulement 60,2% étaient sensibles à l'imipénème. **(Howard et al., 2012)**

De nombreux foyers de multiresistance due à *A. baumannii* ont été documentés dans les hôpitaux d'Asie et du Moyen-Orient. Les taux de non-sensibilité à SENTRY (Programme de surveillance anti-microbienne) des isolats (2001-2004) ont dépassé 25% pour l'imipénème, 40% pour la ceftazidime, et 45% pour la ciprofloxacine. **(Howard et al., 2012)**

On a décrit six phénotypes de résistances aux betalactamines pour *Acinetobacterbaumannii* et ces phénotypes sont utiles aux choix thérapeutiques. Les mécanismes de résistance sont essentiellement enzymatiques. Par ailleurs, 40 à 70 % des souches sont résistantes aux aminosides et 70 % aux fluoroquinolones. Ces résistances expliquent les difficultés thérapeutiques auxquelles sont confrontés les médecins.

Les modèles expérimentaux, et en particulier la pneumopathie murine à *Acinetobacterbaumannii*, le seul publié à ce jour, sont indispensables pour permettre de comprendre la physiopathologie de ces infections et la validation des protocoles thérapeutiques nouveaux ou originaux. Le sulbactam associé ou non, a souvent été utilisé avec succès. De nombreuses autres associations, telle que celui de la rifampicine-colistine réalisée par le **Dr Naija W. et al.,(2009)** à l'hôpital Sahloul Sousse, ont été utilisées avec plus ou moins de succès, mais les infections nosocomiales à *Acinetobacterbaumannii* restent difficiles à traiter.

Dans notre étude aucune souche n'était résistante à la colistine. La colistine a permis de traiter des infections à *Acinetobacterbaumannii* avec succès **(Manikal VM., et al., 2000)**, comme peuvent l'attester les études de **Jiminez et al., (2005)** pour le traitement d'une méningite à *A. baumannii*, **Montero et al.,(2004)** se rapportant à l'efficacité de la colistine dans le traitement des infections pulmonaires à *A. baumannii* et **Michalopoulos et al., (2004)** ont recommandé l'utilisation de la colistine pour le traitement des infections dues à des bacilles à Gram négatif multirésistants.

Cependant, la plupart des études cliniques ayant évalué l'efficacité de la colistine ont présenté des limites importantes (études rétrospectives, absence de groupe témoin, variations dans les doses utilisées et les durées de traitement, association avec d'autres antibiotiques). **(Howard et al., 2012)**

Il est à noter que la résistance à la tigécycline et la polymyxine B existent déjà enAsie et au Moyen-Orient. (**Howard et al, 2012**).

Conclusion

En conclusion, *Acinetobacter baumannii* constitue de loin la principale espèce du genre *Acinetobacter* impliquée en clinique. Nous avons pu déterminer au cours de notre étude que les services les plus touchés par les infections à *A. baumannii* sont les services chirurgicaux et le prélèvement de pus est celui d'où l'on isole le plus la bactérie.

Nous avons enregistré un pourcentage de 85,80 %, 78,08 %, 57,20 % de résistance respectivement à la ceftazidime, la ciprofloxacine, et l'imipénème et 33,09 % de souches productrices BLSE. Nous remarquons que le taux de d'*A. baumannii*BMR est très important et inquiétant.

La sensibilité de la bactérie face à la colistine, fait de cet antibiotique l'un des derniers recours thérapeutiques possibles face aux souches résistantes à toutes les molécules testées. Malgré que pour le moment le taux de résistance à cet antibiotique soit nulle, la situation peut évoluer défavorablement vu sa consommation accrue en thérapeutique.

A. baumannii a su s'adapter au cours du temps pour devenir une bactérie redoutable par ses capacités de persistance en milieu difficile, ses caractéristiques épidémiogènes et sa multi-résistance aux antibiotiques. Face au danger que constitue son émergence il nous paraît important d'énumérer quelques idées et perspectives dans la lutte pour maîtriser l'incidence du pathogène.

Contre la multi-résistance des souches épidémiques, la surveillance stricte et la mise en place de mesures prophylactiques sont des mesures aptes à lutter efficacement contre cette bactérie. (Denis et al., 2007)

Girou E. (2008) propose un programme pragmatique et réaliste (à savoir, faisable) aux professionnels qui souhaitent obtenir des résultats probants dans leurs performances pour réduire la survenue d'infections associées aux soins chez les malades hospitalisés en réanimation. Ce programme pratique se décompose en trois parties :

- la mise en place d'indicateurs de résultats ;
- la mise en place d'indicateurs de moyens ;
- la définition du retour des résultats aux équipes soignantes.

Dans le domaine de la maîtrise du risque infectieux associé aux soins, les indicateurs de résultats doivent être choisis parmi les différents types d'infections, en retenant celles qui apporteront par leur prévention les meilleurs bénéfices cliniques en termes de morbidité et

mortalité. Ainsi, les résultats bénéficient à l'échelon individuel au malade pris en charge et à l'échelon collectif en termes de rapport coût-bénéfice global pour le service.

Les indicateurs de moyens correspondent à l'observance par les soignants (médicaux et paramédicaux) des mesures reconnues efficaces pour prévenir les infections nosocomiales. Cette partie du programme correspond à l'évaluation des pratiques professionnelles pour la maîtrise du risque infectieux.

Enfin, l'ensemble des résultats obtenus doit impérativement être transmis aux équipes soignantes des services pour maintenir une sorte de pression sur les objectifs à atteindre. Le retour des résultats doit être clair, simple et peut consister en un graphique accessible à toutes les catégories professionnelles. L'idéal est de pouvoir combiner un indicateur de moyen avec un indicateur de résultat.



Références Bibliographiques

-
- ✚ **Ait el kadia M., et al.**, 2006, « Prévalence des souches d'*Acinetobacterbaumannii* et de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème par production de métallo- β -lactamases », Médecine et maladies infectieuses, 36, 386–389.
 - ✚ **FillouxAlain, Vallet Isabelle**, 2003, « Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne », M/S : médecine sciences, vol. 19, n° 1, p. 77-83.
 - ✚ **Howard Aoife, O'DonoghueMichael, Feeney Audrey and SleatorRoy D.**, 2012, « *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen », Landes Bioscience, vol 3:3, 243-250.
 - ✚ **KatragkouAspasia, RoilidesEmmanuel**, 2005, «Successful Treatment of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Central Nervous System Infections with Colistin. », journal of clinical microbiology, Vol. 43, No. 9, 4916–4917.
 - ✚ **Ben Haj Khalifa A., Khedher M.**, 2010, « Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*Acinetobacterbaumannii* isolées dans la région de Mahdia », Médecine et maladies infectieuses 40, 126–128.
 - ✚ **BertholomChantal**, 2015, « *Acinetobacter*, une bactérie aux multiples visages », OptionBio n° 534-535.
 - ✚ **Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées aux soins (CTINILS)**, 2007, « DEFINITION DES INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS ».
 - ✚ Courvalin P., 2006, « Antibiogramme », ESKA, 2^{ème} édition.
 - ✚ **DecréDominique**,Avril 2012, « *Acinetobacterbaumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation », REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES -N° 441, 43-52.
 - ✚ Dossier élaboré par les services du **Ministère de la Santé**, 2005, « Les infections nosocomiales », Santé publique /Médecine & Droit, 15–22.
 - ✚ **Drault J.N., et al.**, 2001, « Pneumopathie communautaire à *AcinetobacterBaumannii*. », Annal Français Anesthésie Réanimation (Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS), 20, 795-798.
 - ✚ **Elouennass M., et al.**, 2003, « *Acinetobacterbaumannii* : étude de la sensibilité des souches isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V, Rabat, Maroc », Médecine et maladies infectieuses 33, 361–364.
 - ✚ **Eveillard M., Joly-Guillou M.-L.**, 2012, « Infections émergentes à *Acinetobacterbaumannii*et circonstances favorisant leur survenue », Pathologie Biologie 60, 314–319.

-
- ✚ **SezginFikriyeMilletli, Yilmaz CobanAhmet, GunaydinMurat,** 2012, « Investigation of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* isolates and their colistin susceptibilities in biofilm », *Letters to the Editor / International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (2013), 197–202.
- ✚ **Denis François, PloyMarie-Cécile, Martin Christian, Bingen Edouard, Quentin Roland,** 2007, « Bactériologie médicale, techniques usuelles », Elsevier Masson.
- ✚ **Girou E.,** 2008, « Comment diminuer en pratique les infections nosocomiales en réanimation ? How to decrease in practice nosocomial infections in critically ill patients? », *Reanimation*, 17, 275-279.
- ✚ **Grosjean Jérôme, Clavé Danielle, Archambaud Maryse, Pasquier Christophe,** 2011, « Bactériologie et virologie pratique », De boeck, 2^{ème} édition révisée.
- ✚ **Wiley Joanne M., Sherwood Linda M., WoolvertonChristopher J.,** 2008, « Prescott,Harley, and Klein's Microbiology », The McGraw-Hill Companies, 7^e edition.
- ✚ **Joly-Guillou M.L., et al.,** 2002, « *Acinetobacter* et infections nosocomiales », *Presse Méd.* 31, 651-656.
- ✚ **Lahsoune M., et al.,** 2007, « Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacterbaumannii* dans un CHU marocain », *Médecine et maladies infectieuses* 37, 828–831.
- ✚ **VillarMacarena et al.,** 2014, « Epidemiologic and Clinical Impact of *Acinetobacter baumannii* Colonization and Infection a Reappraisal », *Medicine*, 93, 202–210.
- ✚ **Manikal VM., Landman D., Saurina G., Oydna E., Lal H., Quale J.,** 2000, « Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: Citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. » *Clinical Infectious Diseases*; 31 (1): 101–106.
- ✚ **Michalopoulos AS., Tsiodras S., Rellos K., Mentzelopoulos S., Falgas ME.,** 2005, « Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. » *Clinical Microbiology and Infectious diseases*; 11 (2): 115-21.
- ✚ **Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural, Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques, Document édité avec la collaboration de l'OMS,** « Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) », 6^{ème} édition 2011.

- ✚ **Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN**, « Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques », 14^{ème} rapport d'évaluation 2012-2013.
- ✚ **Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, Réseau Algérien de la Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques AARN**, « Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques », 15^{ème} rapport d'évaluation (de Janvier à Décembre) 2014.
- ✚ **Montero A., Ariza J., Corbella X., et al.**, 2004, «Antibiotic combinations for serious infections caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a mouse pneumonia model. » Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 54 (6): 1085-1091.
- ✚ **HidriNadia**, 2012, « Identification d'*Acinetobacterspp.* au laboratoire », REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES -N° 441, 37-42.
- ✚ **Naija W. et al.**,2009, « RIFAMPICINE-COLISTINE INTRAVEINEUSE POUR LE TRAITEMENT DES INFECTIONS À ACINETOBACTER BAUMANNII MULTIRÉSISTANT », Revue Tunisienne d'Infectiologie, Vol.2 : 15 – 18.
- ✚ **Nemec A., Krizova L., Maixnerova M.**, «Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii sp. nov.* (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis sp. nov.* (formerly *Acinetobacter* genomic species 13&TU).» Res Microbiol 2011, 162:393-404.
- ✚ **Rodriguez-Banõ J. et al.**, 2008, « Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications», Clinical Microbiology and Infection, Volume 14 Number 3.
- ✚ **Sechi LA., Karadenizli A., Deriu A., et al.**, 2004, «PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. » Med SciMonit, 10: CR180–CR184.
- ✚ [AARN](#).
- ✚ [OMS](#) consulter le 27/03/2016 à 23h34.
- ✚ [OMS](#) consulter le 27/03/2016 à 23h35.

Annexes

Annexe 1 : Appareillage, verreries, réactifs et solutions

Appareillage et verreries	Réactifs et solutions
-gants jetables -bec bunsen -étuve d'incubation à 37°C -étuve de séchage à 60°C -réfrigérateur à 4°C -microscope optique -écouvillons stériles -boîte de pétri -Lame et lamelle -pipette pasteur stérile -tube à essai stérile -portoir -distributeur d'antibiotiques -pied à coulisse -pince métallique et en bois -anse de platine -carte d'agglutination -densitomètre -cellule MALASSEZ ou NAGEOTTES	-eau physiologique stérile à 0.9% -eau distillée stérile -eau de javel -eau oxygénée (H ₂ O ₂) -alcool à 95° -violet de gentiane -Lugol -fuschine -bleu de méthylène -réactif de kovacs -NRI et NRII -VPI et VPPII -réactif de tryptophane désaminase TDA -réactif de latex -l'huile de vaseline

Tableau 2 : milieux de culture utilisés

Milieux d'isolements	Milieux d'enrichissements
-gélose nutritive -gélose hecktoen -gélose BCP	-gélose Mueller-Hinton(MH)
Disques imprégnés	
-disques d'ATB	

Tableau 3 : milieux d'isolements et germes correspondants :

Milieux	Germes recherchés
Milieu Hecktoen, gélose BCP	Les bacilles à gram négatifs

Composition des principaux milieux de culture utilisés en gramme par litre d'eau distillée :**1. Milieux gélosés :**

- Milieu gélose nutritive

Extrait de viande de bœuf.....	1g
Extrait de levures.....	2g
Peptone.....	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose.....	15g

pH = 7.3

- Gélose Hecktoen

Extrait de levure.....	3g
Protéase peptone.....	12g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium.....	10g
Saccharose.....	1g
Citrate ferrique.....	3g
Rouge de phénol.....	0.025g
Gélose	12g

pH= 7.3

- Gélose BCP

Peptone	5g
Extrait de viande	3 g
Lactose	10 g

BCP0.025g

Agar15 g

pH= 7

- TrypcaseSoja

Peptone papainique de Soja.....5 g

Peptone trypcase de caséine.....15 g

NaCl5 g

Agar.....15 g

pH= 7.3

- gélose Mueller Hinton

Infusion de viande de bœuf300g

Hydrolysats de caséine.....17.5g

Amidon.....1.5g

Gélose.....10g

pH= 7.4

Toutes les images figurées ci –dessous sont originales



Microscope optique Cellule MALASSEZ



Bec Bunsen Etuve



Les reactifs de la coloration de Gram Bleu de Methylene
(violet de gentiane,Lugol,alcool,Fushine)

Annexe 2 : Fiche de renseignements

MINISTÈRE DE LA SANTÉ, DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE
CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
UNITÉ FRANTZ-FANON
LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
UNITÉ DE MICROBIOLOGIE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

N° d'ordre :

Nom et Prénoms :

Age :

Service :

Nature du prélèvement :

Date : et heure du prélèvement :

Examens demandés :

Traitement éventuel :

- Antibiothérapie : - préventive
- Curative
- Autre traitement :

Renseignements cliniques (maladies associées, antécédents...)

.....

Bilan Biologie :

Autres explorations :

Hospitalisation :

- Motif d'admission :
- Date d'entrée :
- Date de sortie :

Signature et griffe du médecin,

Annexe 2 : La feuille de résultats des examens bactériologiques.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ DE LA POPULATION ET DE LA RÉFORME HOSPITALIÈRE
 CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
 UNITÉ DE FRANTZ-FANON
 LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
 UNITÉ DE MICROBIOLOGIE

FEUILLE DE RESULTATS DES EXAMENS BACTERIOLOGIQUES

EXAMENS DIRECTS

1 - Examens à l'état frais :

- Numération :

Globules blancs	<input type="text"/>
Globules rouges	<input type="text"/>
- Parasites
- Levures
- Cellules épithéliales
- Cristaux
- Cylindres
- Recherche de capsules
- Microscopie à fond noir (Recherche de spirochètes)

2 - Frottis colorés :

- Gram :

Bacilles à Gram négatif	<input type="text"/>
Bacilles à Gram positif	<input type="text"/>
- Cocci à Gram négatif
- Cocci à Gram positif

Score : (Prélèvements vaginaux)

0	1	2	3	4
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Classe : (Sécrétions broncho-pulmonaires)

1	2	3	4	5
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

- MGG

Numération		Aspect
PNN	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Lymphocytes	<input type="text"/>	
- IFD (Immunofluorescence directe).....
- Autres colorations :.....

CULTURE

positive négative

Numération : UFC² * /ml (* Unité formant colonie)

IDENTIFICATION

Espèce bactérienne N° 1

Espèce bactérienne N° 2

Espèce bactérienne N° 3

INTERPRETATION ET COMMENTAIRES

.....

.....

Blida le :

Annexe 2 : Feuille de Résultats : Antibiogramme.

**MINISTRE DE LA SANTE DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE
CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE BLIDA
UNITE DE FRANTZ-FANON
LABORATOIRE CENTRAL DE BIOLOGIE
UNITE DE MICROBIOLOGIE**

FEUILLE DE RESULTATS : ANTIBIOGRAMME

Nom - Prénoms : Age :

N° d'ordre : Service :

Nature du prélèvement :

Germe (s) isolé (s) :

Commentaires :

ANTIBIOTIQUES	SIEGES	RESULTATS				Concentrations critiques mg/l	ANTIBIOTIQUES	SIEGES	RESULTATS				Concentrations critiques mg/l
		S	I	R	CMI mg/l				S	I	R	CMI mg/l	
BETA - LACTAMINES						MACROLIDES							
Penicilline	P					Erythromycine	E						
Oxacilline	OX					Lincosmycine	L						
Ampicilline	AM					Clindamycine	CM						
Amoxicilline	AMX					Pristinamycine	PT						
Ticarcilline	TIC					Spiramycine	SR						
Pipéracilline	PIP					Azithromycine	AZM						
Amox+Ac clavulanique	AMC					QUINOLONES							
Céfazoline/Cefalexine	CZ/CN					Acide nalidixique	NA						
Céfoxitine	FOX					Ofloxacin/Péfloxacine	OFX/PEF						
Céfotaxime/Ceftriaxone	CTX/CRD					Ciprofloxacine	CIP						
Ceftazidime	CAZ					Levofloxacine	LEV						
Impénème	IPM					DIVERS							
Aztreonam	ATM					Tétracycline	TE						
AMINOSIDES						Colistine	CS						
Gentamicine	GM					Cotrimoxazole	SXT						
Amikacine	AM					Furanes	FT						
Tobramycine	TM					Acide fusidique	FA						
Spectinomycine	SPT					Rifamycine	RA						
						Fosfomycine	FOS						
						Vancomycine	VA						
						Metronidazole	MTR						

Interprétation : S:sensible - I : Intermédiaire - R : Résistant.

Annexe 3 : Etat frais, coloration au bleu de méthylène, Coloration de Gram, test à la catalase, test à l'oxydase, la galerie Api 20 E, Api NE

1. Etat frais

Principe : il nous oriente sur la morphologie, la mobilité et le mode de groupement. Il permet d'évaluer la quantité des bactéries en absence de toute fixation ou coloration et sur la présence de leucocyte, hématies et de levures.

Technique : cet examen se pratique à partir du prélèvement. On dépose sur une lame propre et stérile une goutte prélèvement, ceci à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ; on recouvre la lame par une lamelle, puis observer au microscope optique au grossissement ($\times 400$).

2. Coloration au bleu de méthylène

Principe : c'est une coloration simple et rapide qui permet d'apprécier la morphologie des bactéries et les détails pouvant échapper lors d'un examen à l'état frais (présence de spores, le regroupement cellulaire...). Sur le plan pratique, cette technique a peu d'échecs, mais elle ne permet pas de différencier les bactéries ayant une même morphologie.

Technique : elle est réalisée suivant les étapes suivantes :

- Réaliser un frottis, le sécher et le fixer ;
- Recouvrir la lame par le bleu de méthylène ;
- Laisser agir pendant dix minutes ;
- Laver à l'eau de robinet, puis sécher ;
- Ajouter une goutte d'huile d'immersion puis observer au microscope au grossissement ($\times 1000$).

3. Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram permet de distinguer les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Cette différence de coloration est liée à des différences de nature de la paroi bactérienne.

Elle permet de renseigner sur :

- Le type Gram + ou Gram -

- la forme des bactéries
- la taille
- le mode de regroupement

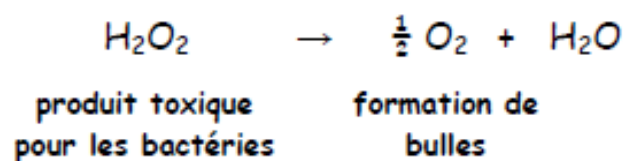
Technique

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Plonger la lame dans le violet de gentiane (ou cristal violet) phéniqué pendant 1 minute.
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Plonger la lame dans une solution de lugol pendant 1 minute
- Laver à l'eau distillée
- Décolorer dix secondes à l'alcool.
- Rincer immédiatement à l'eau distillée
- Plonger la lame dans la safranine (ou la fuchsine) phéniquée pendant 1 minute
- Laver la lame à l'eau distillée.
- Sécher la lame en la tamponnant avec du papier Joseph.
- Observer à l'objectif x100 à l'immersion dans l'huile et à pleine lumière.

4. Catalase

Principe

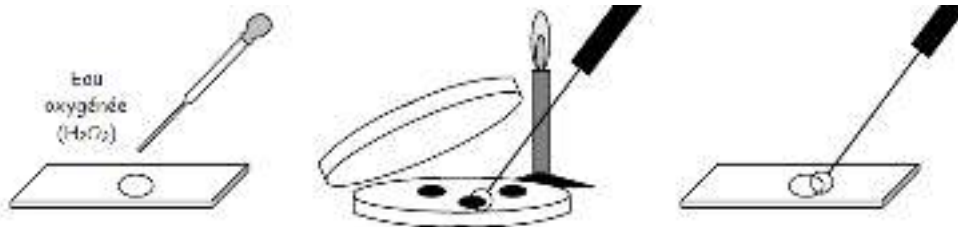
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



Technique

- Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- Prélever une colonie à l'aide de l'anse
- Dissocier la colonie dans la goutte



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

Lecture et interprétation

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase +	Catalase -
	

Causes d'erreurs :

- Réalisation du test sur un milieu contenant la catalase

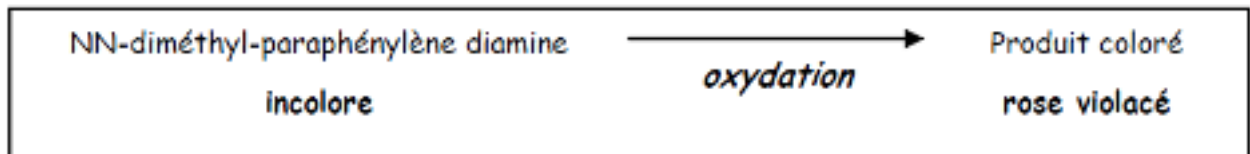
Exemple : réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)

- Quantité de bactéries insuffisante
- Eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

5. Oxydase

Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



Technique

- Placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- Déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- Avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque





Remarque :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

Lecture et interprétation

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase +	Oxydase -
	

Cause d'erreur

- Réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cacher une respiration)
- Humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif

- Quantité de bactéries insuffisante
- Réactif périmé (le tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- Utilisation d'un instrument « oxydase + »
- Lecture trop tardive : au-delà de 30 secondes

6. Galerie Api 20E

Principe

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation).
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (5 ml) ou une ampoule d'API Suspension Medium (5 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions" de la notice du produit, ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette ou d'une PSIpette, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélosé. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette ou de la PSIpipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) :

- pour les tests CIT, VP et GEL, remplir tube et cupule,

- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),

- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

- Refermer la boîte d'incubation.

- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

Lecture et interprétation

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou –) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

NOTE : Le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

- Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à 3 :

- Réincuber la galerie 24 heures (± 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.

- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs (voir paragraphe précédent).

- Pour compléter l'identification, il peut être utile de réaliser des tests complémentaires (se reporter au paragraphe Identification).

Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

• Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. La galerie API 20 E comportant 20 tests, en additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21ème test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

• Identification :

Elle est réalisée à partir de la base de données (V4.1)

* à l'aide du Catalogue Analytique :

- Rechercher le profil numérique dans la liste des profils.

* à l'aide du logiciel d'identification apiweb TM :

- Entrer manuellement au clavier le profil numérique à

7 chiffres.

7. Galerie Api NE

Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

Technique

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée [ou toute eau sans additif ou dérivés susceptibles de libérer des gaz (Ex : Cl₂, CO₂ ...)] dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. (Ne pas inscrire la référence sur le couvercle, celui-ci pouvant être déplacé lors de la manipulation.)
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit ou utiliser un tube contenant 2 ml de solution saline à 0.85 %, sans additif.
- A l'aide d'une pipette, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique, par aspirations ou par touches successives. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension d'opacité égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : Pour le bon fonctionnement des tests de la galerie API 20 NE, il est très important d'ajuster la densité de l'inoculum au point 0,5 de McFarland. En particulier, une turbidité plus faible conduit à des résultats faussement négatifs. Ne pas toucher les cupules lors des manipulations et veiller à ne pas laisser la galerie exposée à l'air longtemps après inoculation.

Lecture et interprétation

Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

• Test NO₃ :

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc.

La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

• Test TRP :

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

Annexe 4 : fiche de résultats galeries Api 20E, 20NE

api[®] 20 E

1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4

SHPI SDC LDC DDC LGL H₂ SBE TSA NO LPE LBL GLU MAN PNI OPR YHA SAC MEL AMP ASA OX N₁ N₂ MIB MAC OF-2 OF-P

Ident.

api[®] 20 NE

CE 07224 B

REF : _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origin / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOHERIEX

24 h 48 h

NO₂ TRP GLU SDC SBE ESC GEL PNI GLU ASA MNE MAN SAG MAL GAT CAP LADL MAL LOT PNC OX

24 h 48 h

Autres tests / Other tests / Anders Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλα τεστ / Άλλα τεστ /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Annexe 5 : tableau de lecture de la galerie miniaturisée Api 20E

Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			négatif	positif
ONPG	Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Beta-galactosidase	incolore	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Rouge/orangé
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase	jaune	orangé
ODC	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
CIT	Citrate de sodium	Utilisation su citrate	vert pale/jaune	Bleu-vert/vert
H2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/fin liseré
URE	Urée	Uréase	jaune	Rouge/orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA/ Immédiat	
			Jaune	Marron foncé
IND	Tryptophane	Production d'indole	IND/ 2mn, maxi	
			jaune	Anneau rouge
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoine	VP 1+ VP 2/10mn	
			Incolore	Rosé-rouge
GEL	Gélatine de kohn	gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
MAN	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
INO	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
SOR	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
RHA	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
SAC	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
MEL	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune

ARA	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	jaune
OX	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	Ox /5-10mn	
			incolore	Anneau violet
NO3-NO2	Tube GLU	Production de NO2	NIT 1+ NIT2 / 2-3mn	
			Jaune	rouge
		Réduction au stade N2	ZN	
			rouge	jaune
MOB	Microscope	mobilité	Immobilité	mobile
MAC	Mileu de MacConkey	Culture sur	Absence	présence
OF	Glucose	Fermentation : sous huile	Vert	Jaune
		Oxydation : à l'air	vert	jaune
CAT		Possession d'une catalase	H2O2 / 1-2 mn	
			Pas de bulles	bulles

Annexe n° 5 : Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée Api 20NE

tests	Substrat	Enzymes/Réactions	Résultats	
			négatif	positif
NO3	Nitrate de potassium	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1 +NIT2 /5mn	
			Incolore	Rose -rouge
TRP	Tryptophane	Réduction des nitrates en azote	ZN/5mn	
			Rose	Incolore
GLU	Glucose	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine	hydrolase	jaune	Gris/marron/noir

GEL	Gélatine	Hydrolase	Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG	p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside	B-galactosidase	Incolore	jaune
GLU	Glucose	Assimilation	Transparence	Trouble
ARA	Arabinose			
MNE	Mannose			
MAN	Mannitol			
NAG	N-acétyl-glucosamine			
MAL	Maltose			
GNT	Gluconate			
CAP	Caprate			
ADI	Adipate			
MLT	Malate			
CIT	Citate			
PAC	Phényl-acétate			
Ox	Tétraméthyl-p-phenylène diamine			

Annexe 6 : Quelques étapes pour la réalisation de l'antibiogramme.



Réalisation de la suspension 0.5MF



l'ensemencement par l'écouvillon



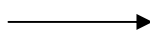
Dépos des disques d'antibiotiques par une pince ou par un distributeur d'antbiotiques



Antibiogramme pour *Acinetobacter baumannii*
d'inhibitions



Incubation Mesure des diametres des zones



Annexe 7 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Acinetobacter* spp

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ticarcilline	75 µg	14	15 – 19	20	128	32-64	16	Le disque de TCC doit être placé à côté du disque de CAZ. Une synergie entre les 2 disques indique la présence d'une BLSE.
Ticarcilline + ac.clavulanique	75/10µg	14	15 - 19	20	128/2	32/2-64/2	16/2	
Pipéracilline	100 µg	17	18 – 20	21	128	32-64	16	
Céftazidime	30 µg	14	15 – 17	18	32	16	8	
Imipénème	10 µg	13	14 – 15	16	16	8	4	
Amikacine	30 µg	14	15 – 16	17	64	32	16	
Gentamicine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4	
Tobramycine	10 µg	12	13 – 14	15	16	8	4	
Nétilmicine	CMI	----	-----	-----	32	16	8	
Ciprofloxacine	5µg	15	16 – 20	21	4	2	1	
Lévofloxacine	5µg	13	14 – 16	17	8	4	2	
Doxycycline	30µg	9	10 – 12	13	16	8	4	Si résistance à doxycycline, réponse valable pour Tétracycline
Triméthoprimé+	1.25/23.75µg	10	11 –	16	4/76	-----	2/38	

Sulfaméthoxazole			15					
Colistine	-----	-----	-----	-----	> 2		2	La colistine est testée pour usage thérapeutique. Il faut déterminer la CMI.
Rifampicine**	30µg	14	14 – 18	19	> 16	16-8	4	Lecture valable pour <i>S.maltophilia</i> - Diluer l'inoculum 0,5 MF au 1/10ème Tester avec un inoculum 0,5MF dilué au 1/10 ^{ème}