

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE BLIDA -1-

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de
Master II en biologie
Option : Microbiologie - Bactériologie

Thème

Isolement, Identification et Etude de la sensibilité aux
Antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolées au niveau
de l'hôpital de Koléa

Présenté par :

Soutenu le :23-10-2014

M^{elle} : BEN KHEDIDJA Meriem

Devant le jury composé de :

M^{me} Saadi. L : Maitre assistante classe A USDB présidente

M^{me} Zerkaoui. A : Maitre assistante classe AUSDB Examinatrice

M^{me} Mohammed Mahmoud. F : Maitre assistante classe A USDB promotrice M^{lle} Lallaoui. F.

N : Assistante en microbiologie EPH Koléa Co promotrice

Promotion : 2013 - 2014

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire central, unité bactériologie, d'EPH Koléa

Je tiens à remercier, madame la Promotrice, Mohamed Mahmoud Fadhila maitre assistante de classe A à l'Université de Blida 1, pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien.

Je tiens à remercier sincèrement Docteur Lallaoui Farah Nassila assistante en microbiologie à l'EPH Koléa qui m'a apporté une aide précieuse dans la réalisation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à

M^{me} Saadi. I., maitre assistante de classe B à l'Université de Blida 1 qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury je l'en remercie profondément.

M^{me} Zerkaoui. A., Maitre assistante de Classe A à l'Université de Blida 1 m'a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner ce travail.

M' Aouni Djamal., de m'avoir accueilli au niveau de son laboratoire.

Je tiens à remercier aussi

M^{me} Boudisfayza , M' Zaybak Toufik, M^{me} Khair-Eddine Djamila et la famille Ait GueniSsaïd pour ses aides et conseils.

Tout le personnel d'unité bactériologie du laboratoire central D'EPH Koléa.

Mes remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant est achevé ce modeste travail que je dédie :

La lumière de ma vie, mes très chers parents lui ont toujours été à mes côtés, qui m'ont soutenue et encouragé, et qui sans leurs amours, leurs compréhensions, leurs conseils et leurs tolérances je n'aurais jamais pu atteindre mes objectifs.

Papa, Maman je vous dis merci, et que Dieu vous protège pour nous.

A mes chers frères : Youcef Abd El Kader et Hamza que je les souhaite une belle vie.

A ma chère sœur Charifa et son mari qui n'ont pas cessé de m'aider à chaque occasion.

A mes petits papillons que j'aime beaucoup : Sérine Asma et Abd El Barie.

A toute ma famille maternelle et paternelle sans exception.

A mes chères copines qu'avec elles j'ai passé les meilleurs moments de ma vie : Zineb,

Sauad Soumia Rachida.

A tous les étudiants de biologie surtout l'option

Microbiologie bactériologie.

A tous ceux que j'aime et m'aiment je dédie ce mémoire que j'espère être à la hauteur de leurs espérance à moi.

Meriem

Abréviations :

AMP : ampicilline

BGNF : bacilles à Gram négatif non fermentaires

CTX : céfotaxime

E. coli : *Escherichia coli*

FOS : fosfomycine

GEN : gentamicine

KZ : céfazoline

NA : acide nalidixique

PIP : pipéracilline

RM : rouge de méthyle

SXT : Triméthoprim+ sulfaméthoxazole

TIC : ticarcilline

TOB : tobramycine

VP : Voges-Proskauer

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : les données bibliographiques	
I.1 Generalité sur les <i>Entérobacteriaceae</i>	3 - 11
I.1.1 Classification.....	3
I.1.2. Habitat et pouvoir pathogène	3
I.1.3. Caractères bactériologique	3-5
I.1.4 Tribu des <i>Eschérichiae</i>	5-9
I.1.5 Tribu des <i>Klebsiella</i>	9-10
I.1.6 Tribu <i>Proteae</i>	10
I.1.7 Tribu des <i>Yersinia</i>	10
I.2 Généralités sur les bacilles à Gram négatif non fermentaires.....	11-13
I.2.1 Classification.....	11
I.2.2 Habitat et pouvoir pathogène	11
I.2.3 Le genre <i>Pseudomonas</i>	11
I.2.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
I.2.4 Le genre <i>Acinetobacter</i>	12
I.2.4.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
I.3 Autres bacilles à gram négatif.....	13
II les antibiotiques	13-16
II.1 Définition	13
II.2 Classification	13-16
II.3 Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	17-19
III. Sensibilité aux antibiotiques et mécanisme de résistance chez les bacilles à Gram négatif	20-22
III.1 Sensibilité aux antibiotiques chez les Entérobactéries	20
III.2 Sensibilité aux antibiotiques chez les <i>Pseudomonas</i>	21
III.3 Sensibilité aux antibiotiques chez les <i>Acinetobacter</i>	22

Chapitre II : Matériel et méthode

I : Matériel	23
II. Methodes	23_39
II.1 Examen microbiologique de différents prélèvements	23-26
II.2 Identification des germes isolés	27-38

Chapitre III : résultats et discussion

I. Analyse microbiologique	39-50
1.Répartition de prélèvements après culture	39
2.La fréquence des souches isolées.....	41
3.Répartition des bacilles à Gram négatif isolées	41
4.Répartition des bacilles à Gram négatif isolées en fonction des prélèvements	42
5.Répartition des souches selon les services.....	42
6.Répartition de prélèvements selon le sexe	42-44
II. Profil de sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolées.....	45-50

Liste des tableaux

Tableau 1 : les caractères différentiel des tribus des <i>Entérobacteriaceae</i>	5
Tableau 2 : Caractères généraux et classification des <i>Salmonella</i>	7
Tableau 3 : Principaux caractères distinctifs de genre <i>Shigella</i>	8
Tableau 4 : Caractères biochimiques différentiels des principaux espèces de germe <i>Escherichia coli</i>	9
Tableau 5 : Principaux caractères distinctifs entre les genres <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> <i>Serratia</i>	10
Tableau 6 : Classification et spectre d'activité des bêta lactamines	16
Tableau 7 : Phénotype de résistance naturelle des entérobactéries.....	21
Tableau 8 : Phénotype de résistance « pénicillinase acquise »des entérobactéries.....	23
Tableau 9 : l'origine et le nombre de prélèvements.....	24
Tableau 10 : l'examen direct et la mis en culture des prélèvements.....	25
Tableau 11: es antibiotiques testés pour chaque espèce bactérienne isolée.....	37
Tableau 12: la distribution des souches selon les prélèvements.....	41
Tableau 13 : la répartition des isolats selon les services.....	42
Tableau 14: Pourcentage de résistance des souches <i>Escherichia coli</i>	45
Tableau 15 : pourcentage de résistance de souches <i>Klebsiella spp</i>	46

Liste des figures

Figure 1 : Différents étapes d'identification des isolats.....	27
Figure2 : Répartition des prélèvements après culture.....	39
Figure 3 : Répartition des souches isolées.....	40
Figure 4: Distribution des bacilles à Gram négatif isolées	40
Figure 5 : La répartition des souches en fonction des prélèvements.....	41
Figure 6: Répartition des infections urinaires selon le sexe.....	43
Figure 7 : Répartition des prélèvements de pus selon le sexe	44
Figure 8: Pourcentage de résistance des <i>Escherichia coli</i>	45
Figure 9 : Pourcentage de résistance des souches <i>Klebsiella spp</i>	47
Figure 10 : Pourcentage de résistance des souches <i>Proteus mirabilis</i>	48
Figure 11 : Pourcentage de résistance des souches d' <i>Enterobacter spp</i>	49
Figure 12 : Pourcentage de résistance des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Figure 13 : Pourcentage de résistance des souches <i>Acinetobacter baumannii</i>	51

Résumé :

Ce travail est basé sur l'identification des bacilles à Gram négatif et l'étude de leurs fréquences de résistances aux antibiotiques. Ces isolats proviennent de différents prélèvements des patients consultants et hospitalisés au niveau d'EPH Fares Yahia Koléa.

L'étude port sur 1701 prélèvements d'origine diverse pendant 4 mois. 89,92% des *Entérobactéries* (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus*, *Enterobacter*) et 10,08% des bacilles à Gram négatif non fermentaires (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Pasteurella multocoda*) ont été isolées dans de l'ensemble des infections bactériennes étudiées. Les fréquences de résistance vis-à-vis les antibiotiques testés chez les souches hospitalières sont plus importants que chez les souches communautaires, par exemples, dans le cas de céfixime les souches de *klebsiella spp* hospitalières plus de 75% sont résistantes par contre les souches communautaires présentent que 12,5% de résistance.

Le taux alarmant de résistance aux antibiotiques des souches des bacilles à Gram négatif isolées principalement dans les services d'hôpital nécessite la mis en place d'une stratégie efficace de lutte contre les infections nosocomiales et les infections aux bactéries multirésistantes.

Les mots clé : les Entérobactéries, les bacilles à Gram négatif non fermentaires, les infections nosocomial, la résistance aux antibiotiques, les bactéries multirésistantes.

Abstract:

This work is based on the identification of Gram-negative bacilli and the study of their frequency of antibiotic resistance. These isolates from different samples (consultants and hospitalized patients) at Yahia Fares hospital

The 1701 harbor study samples of various origins for 4 months (from 12 March to 17 July 2014) 89.92% Enterobacteriaceae and 10.08% Gram-negative bacilli were not isolated in fermentation of all infections bacterial studied. Frequencies of resistance of antibiotics tested in hospital strains are more important than community strains.

The alarming rate of antibiotic-resistant strains of Gram-negative bacilli isolated mostly in hospital services requires the set up of an effective strategy to fight against nosocomial infections and infections with resistant bacteria.

Key words: Enterobacteriaceae, bacilli Gram negative not fermentative, the nosocomial infections, antibiotic resistance, multi-resistant bacteria.

الملخص:

يستند هذا العمل على تعيين عصيات سلبية الغرام ودراسة نسب مقاومتها للمضادات الحيوية حيث حصلنا على هذه البكتيريا من عينات طبية مختلفة المصدر إما من داخل أو خارج المؤسسة العمومية الاستشفائية فارس يحي بالقلية .

بعد دراسة 1701 عينة ذات مصدر مختلف لمدة 4 أشهر حصلنا على 89,92% من الإمعائيات (les entérobactéries و نسبة 10.08% العصيات سلبية الغرام الغير المخمرة (bacilles à Gram négatif non fermentaires) نسب المقاومة عند البكتيريا المعزولة في المستشفى كانت اكبر من نسب مقاومة البكتيريا المعزولة من خارج المستشفى.

المعدل العالي لنسب المقاومة للمضادات الحيوية من طرف البكتيريا المعزولة في المستشفى ينذر بالخطر وعليه يجب أن تتخذ الإجراءات اللازمة وإيجاد الحلول الردعية لعدوى المستشفيات (les infections nosocomiales و للبكتيريا متعددة المقاومة (bactéries multirésistantes).

الكلمات الرئيسية: الامعائيات، العصيات سلبية الغرام الغير مخمرة، عدوى المستشفيات، مقاومة

المضادات الحيوية، البكتيريا متعددة المقاومة.

Introduction

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des bactéries qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux et peuvent dans certain cas causer des infections. On estime que le nombre de bactéries de la flore commensale est dix fois plus élevé que le nombre de cellules d'un organisme humain (Nauciel et Vilde, 2005).

Le diagnostic biologique d'une infection bactérienne repose sur la mise en évidence de l'agent infectieux et/ou sur la réponse immunitaire du patient. Le choix des investigations à pratiquer nécessite une bonne concertation entre le clinicien et le biologiste. Il est essentiel de fournir des renseignements cliniques avec les demandes d'examen (Nauciel et Vilde, 2005).

Les Entérobactéries et les bacilles à Gram négatif occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse et sont parmi les souches les plus fréquemment isolées chez les patients hospitalisés. Elles sont souvent responsables d'infections urinaires, pulmonaires, de septicémies mais également d'autres infections intra-abdominales. *Escherichia coli* est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont des pathogènes opportunistes, souvent responsables d'infections pulmonaires et de bactériémies sévères, notamment dans les unités de soins intensifs. Ces infections nosocomiales sont à l'origine de mortalité et de morbidité élevées partout dans le monde, ces bactéries naturellement résistantes à plusieurs antibiotiques ont la particularité d'acquies plusieurs mécanismes de résistance. Les familles des *Entérobacteriaceae* et des bacilles à Gram négatif non fermentaires comptent actuellement plus de 100 espèces bactériennes, une vingtaine d'espèces bactériennes présentent un intérêt médical et sont fréquemment isolées au laboratoire (Baba Ahmed-Kazi Tani, 2014).

Les antibiotiques sont des molécules produites par des microorganismes ou par synthèse chimique dont l'activité bactériostatique ou bactéricide se manifeste à dose faible. Depuis le début des années 60, nous assistons à une augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, et à l'émergence de nouvelles résistances. Il s'agit d'un problème de santé publique extrêmement préoccupant, qui affecte de nombreux pays, bien que les souches résistantes soient souvent différentes d'un pays à l'autre (Mirabaud, 2003).

L'objectif de notre étude est l'isolement et l'identification des bacilles à Gram négatif dans les différents prélèvements pathologiques ainsi que l'étude de leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.

Nous commencerons par un bref rappel sur les Entérobactéries et les BGNF et les types d'infections qu'ils génèrent, ainsi que sur les modes de résistance aux antibiotiques.

Puis nous aborderons l'analyse détaillée d'identifier des bactéries isolées.

Enfin, nous conclurons notre travail par la discussion des résultats obtenus et quelques propositions concernant la prévention.

Les bacilles à Gram négatif représentent un très vaste groupe de bactéries réparties en plusieurs familles, *Entérobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, bacilles à Gram négatif non fermentaire et les anaérobies strictes. Deux familles sont fréquemment isolées en bactériologie médicale qui sont les *Entérobacteriaceae* et les bacilles à Gram négatif non fermentaires.

I. Bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies

I.1 Généralités sur les *Entérobacteriaceae*

Les *Entérobacteriaceae* constituent une famille des bactéries comportant de nombreux genres subdivisés eux même en espèces (Nauciel et Vilde, 2005). La création de ce groupe a été proposée par RAHN en 1973 qu'il dénomma *Entérobacteriaceae* et dans lequel il rassembla les genres bactériens déjà décrits (*Escherichia*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Shigella*) dans le genre unique *Enterobacter* (Joly et Reynaud, 2003).

Les Entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif dont la plupart sont mobiles grâce à des flagelles disposés d'une manière péritriche ou immobiles et sont non sporulés. Elles cultivent facilement sur les milieux usuels et sont aéro-anaérobies facultatifs. Elles dégradent le glucose par métabolisme fermentatif, avec ou sans production de gaz, elles réduisent les nitrates en nitrites et elles ont une oxydase négative (Avril et al., 2000).

I.1.1 classification :

La classification des Entérobactéries est basée sur une approche d'abord empirique (la morphologie la coloration de Gram, l'aspect des colonies, l'aérobiose ou l'anaérobiose, les caractères métaboliques et les caractères antigéniques) puis par une approche moléculaires (l'hybridation ADN-ADN, les gènes des ARN ribosomiaux, le séquençage complet). La famille des *Enterobacteriaceae* comprend actuellement 100 espèces répertoriées. Les espèces les plus communément isolées en bactériologie clinique appartiennent à 12 genres : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Baba ahmed- kazi tani, 2014).

I.1.2 Habitat et pouvoir pathogène :

Les Entérobactéries sont largement retrouvées sur les plantes, dans le sol, dans l'eau et le tube digestif de l'homme et des animaux. Elles constituent en effet une part prépondérante de la flore intestinale de l'homme mais sont relativement peu rencontrées dans d'autres sites du corps. (Freney et al., 2007). Les Entérobactéries sont responsables de deux grands types de manifestations pathologiques : pathologie spécifique telle la typhoïde avec *Salmonella typhi* ou

d'une pathologie opportuniste : les infections nosocomiales, les infections urinaires, les gastroentérites (Denis et al., 2007).

I.1.3 Caractères bactériologiques :

I.1.3.1 Caractères cultureux :

L'ensemble de ces bactéries pousse habituellement très aisément sur milieux ordinaires. La température optimale de croissance est généralement de 35 à 37°C. Elles sont toutes aéro-anaérobies facultatives. L'aspect général des colonies de ces bactéries sur gélose nutritive est florissant : colonie de 1 à 3 mm de diamètre généralement bombées, lisses et brillantes. Certaines bactéries envahissent la gélose en voile montrant des vagues successives ex : *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*. Le plus souvent, ces colonies sont opaques et blanchâtres, mais il en est de plus transparentes telles les *Salmonella*, des pigmentés telles les *Serratia* en rouge. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges et luisantes (Denis et al., 2011).

I.1.3.2 Caractères biochimiques :

L'identification par des techniques issues de la biologie moléculaire n'est pas encore à la portée de tous les laboratoires. La recherche des caractères biochimiques demeurent les moyens d'identification couramment mis en œuvre. Les différents caractères biochimiques (TDA, uréase, VP et la mobilité) sont représentés dans le tableau 1 :

Tableau1 : Caractères différentiels des tribus des *Entérobacteriaceae* (Bidet et Bengen, 2007).

Tribu	<i>Escherichiae</i>	<i>Klebsiellae</i>	<i>Proteae</i>	<i>Yersinia</i>
Principaux genres isolés chez l'homme	<i>Escherichia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Yersinia</i>
	<i>Salmonella</i>	<i>Raoultella</i>	<i>Providencia</i>	
	<i>Shigella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Morganella</i>	
	<i>Citrobacter</i>	<i>Hafnia</i>	<i>Tatumella</i>	
	<i>Edwardsiella</i>	<i>Pontoae</i>		
	<i>Kluyvera</i>	<i>Erwinia</i>		
	<i>Moellerella</i>	<i>Serratia</i>		
	<i>Leclercia</i>	<i>Cedecea</i>		
	<i>Leminorella</i>	<i>Rahnella</i>		
	<i>Yokenella</i>	<i>Ewingella</i>		
TDA	-	-	+	-
Uréase	-	d	d	+
VP à 37°c	-	d	- sauf <i>Tatumella</i>	-
VP à 22°c	-	d	d	d
Mobilité	Tous sauf <i>Shigella</i>	Tous sauf <i>Klebsiella</i> et <i>Raoultella</i>	Tous sauf <i>Tatumella</i>	Immobiles à 37° et mobiles à 22°C

- : test négatif

+ : test positif

d : Différent suivant les genres ou les espèces

I.1.3.3 Caractères antigéniques:

L'identification biochimique doit être complétée pour certains genres (*Salmonella* et *Shigella*) par la sérotypie. Celle-ci n'a de sens qu'une fois le genre ou l'espèce est déterminée, car les communautés antigéniques interespèces et intergenres sont nombreuses. Les *Entérobactéries* possèdent plusieurs antigènes différents :

- Antigènes O : antigène de paroi constitué de lipopolysaccharides(LPS) thermostable
- Antigène H : antigène flagellaire constitué de flagelline thermolabile
- antigène K : antigène capsulaire constitué de couches externes de polysaccharides qui peuvent masquer l'antigène O ;

- antigène de Kunin ou *Entérobacteriaceae common antigen* (ECA).
- Antigènes d'adhésines (pili, fimbriae). (**Denis et al., 2007**)

I.1.4 Tribu des *Escherichiae* : (*Entérobactéries VP⁻, TDA⁻ et uréase⁻*)

Ce groupe défini par des caractères négatifs, comprend 4 genre principaux : *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonelle*, et *Citrobacter*. Il y a d'autres genres qui possèdent les caractères biochimiques de définition de cette tribu mais ils sont rarement retrouvés dans les isolats humains. Ces genres sont *Edwardsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Yokenella* (**Denis et al., 2011**).

I.1.4.1. *Salmonella* :

Les *Salmonella* sont des parasites de l'homme, des mammifères, des oiseaux et des animaux à sang froid. Elles sont responsables, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives. Le principal mode de contamination chez l'homme est l'ingestion d'eau et aliments contaminés par ces bactéries (**Anonyme 2002 – 2003**). Les caractères généraux de différentes espèces et sous espèces de genre *Salmonella* sont représentés par le tableau 2.

D'après Les travaux **d'Avril et al., 2002** de taxonomie, en particulier par hybridation de l'ADN, ont permis de conclure que le genre *Salmonella* ne comportait que deux espèces, *Salmonella enterica* étant la plus fréquente, composée de 6 sous espèces qui correspondent aux anciens sous genres **I, II, III, IV** de kauffmann et *Salmonella bongori* (très rare). Les différents sous espèces sont :

- Sous espèces **I** : *Salmonella enterica* subspecies *enterica*
- Sous espèces **II** : *Salmonella enterica* subspecies *salamae*
- Sous espèces **III a** : *Salmonella enterica* subspecies *arizonae*
- Sous espèces **III b** : *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae*
- Sous espèces **IV** : *Salmonella enterica* subspecies *houtenae*
- Sous espèces **VI** : *Salmonella enterica* subspecies *indica*

Tableau2 : Caractères généraux et classification des *Salmonella*. (Avril et al., 1992)

Propriétés et caractères biochimiques	<i>Salmonella enterica</i> sous-espèces						<i>S. bongori</i>
	Sous espèce	<i>Enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>
ONPG (2h)	-	-	+	+	-	d	+
Gélatinase à 36°C	-	+	+	+	+	+	-
β -glucuranidase	d	d	-	+	-	d	-
α glutamyl transférase	d	+	-	+	+	+	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Galacturonale	-	+	-	+	+	+	+
L(+)-tartrate	+	-	-	-	-	-	-
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	+

Symboles : + : positif pour 90 à 100% des souches ; - : négatif pour 90 à 100% des souches ; d : variable selon les souches.

I.1.4.2. Shigella :

Les *Shigelle* sont des parasites de l’homme elles entraînent une colite infectieuse endémo-épidémique, la dysenterie bacillaire (shigellose). Certaines souches de *Shigella* produisent aussi une toxine à activité entérotoxique et neurotoxique, responsable du syndrome hémolytique urémique (SHU). Les *Shigelle* sont classées en quatre espèces elles-mêmes divisés en sérotypes selon leurs caractères antigéniques.

— **Groupe A : *S. dysenteriae*** : il en existe 10 sérotypes différents, dont le type 1 s'appelle le bacille de Shiga. Celui-ci produit aussi une exotoxine protéique qui provoque des troubles paralytiques chez les sujets atteints.

— **Groupe B : *S. flexneri*** : six sérotypes.

— **Groupe C : *S. boydii*** : 15 sérotypes.

— **Groupe D : *S. sonnei*** : un seul type. (Tableau 3)

Tableau 3 : Principaux caractères distinctifs de genre *Shigella* (le Minor et al., 1990)

Espèces caractères	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>
Mannitol	-	+/-	+	+
ODC	-	-	-/+	+
Indole	d	d	d	-
ONPG	-/+	-	-/+	d
Fermentation du				
Dulcitol	-/ +	-/+	-/+	-
Xylose	d	- /+	d	-
Rhamnose	d	d	-/+	+

- : négatif + : positif +/- : positif ou négatif d : différents suivant les genres ou les espèces

II.1.4.3. *Escherichia coli* :

E. coli est l'espèce aérobie quantitativement la plus importante dans l'intestin, présente à raison de 10⁷ à 10⁹ corps bactériens par gramme de selles (DELLARAS, 2007). Certaines souches, possédant des facteurs de pathogénicité qui peuvent être responsables d'infection intestinales :

- *E. coli entérotoxigènes* (ECET): syndrome cholériforme. Epidémies chez les enfants dans les pays en voie de développement, diarrhées du voyageur.
- *E. coli entérotoxigènes* (ECEP) : Diarrhées infantiles aiguës ou chroniques. Epidémies dans les maternités ou les crèches.
- *E. coli entéro-invasifs* (ECEI) : syndrome dysentérique. Diarrhées chez les adultes.
- *E. coli entérohémorragiques*(ECEH) : colites hémorragiques, syndrome hémolytique et urémique
- *E. coli entéro agrégants* (ECEAgg) : Diarrhées persistantes.

Et des infections extra-intestinales : infection urinaire, bactériémie, méningites néonatales, suppuration diverses (infections ostéo-articulaire...), prostatites, infections puerpérales (Freney et al., 2007)

Tableau 4: Caractères biochimiques différentiels des principales espèces du genre *Escherichia* (Abbott et al., 2003)

Espèce / caractère	<i>E. coli</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. albertii</i>	<i>E. blattae</i>
Pigment jaune	-	+	d	-	-	-
Mobilité (36°C)	+	+	+	+	-	-
ONPG	+	+	+	d+	+	-
Indole	+	+	-	+	-	-
LDC	+	-	+	+	+	+
ODC	d+	+	-	+	+	+
ADH	d	-	d	-	-	-
Citrate de Simmons	-	-	-	-	-	d+

+ : au moins 85% des souches donnent un résultat positif.

- : au moins 85% des souches donnent un résultat négatif.

d : résultat positif pour 16 à 50% des souches.

d+ : résultat positif pour 51 à 84% des souches.

I.1.4.4. *Citrobacter* :

Actuellement le genre *Citrobacter* comprend 11 espèces : *C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. fameri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii*, *C. rodentium*, *C. gillennii*, *C. murliniae*. Ce sont des saprophytes répandues dans l'environnement et sur la nourriture végétale. A l'exception de *C. rodentium* ces espèces font partie de la flore intestinale normale de l'homme. Elles peuvent être responsables des infections du tractus urinaire, des infections nosocomiales, des diarrhées sporadiques chez les enfants, des infections respiratoires, bactériémies... (Muriel et al., 2007)

I.1.5 Tribu des *Klebsiellae* (KES VP⁺):

Dans le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dit KES., sont rassemblées des *Entérobacteriaceae* qui ont en commun les caractères suivants :

- 1) La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive.
- 2) Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes.
- 3) Ces espèces sont souvent multirésistantes aux antibiotiques (Denis et al., 2007).

Le tableau qui suit représente les principaux caractères distinctifs entre les genres de ce groupe.

Tableau 5 : Principaux caractères distinctifs entre les genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*. (Avril et al., 2002)

Genre / caractères	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>
Mobilité	-	+	+
ODC	-	+	(+)
ADH	-	d	-
DNase	-	-	+
Gélatinase	-	-	+

(+) : Exceptions d : caractère variable. + : test positif - : test négatif

I.1.5.1. Klebsiella:

Quatre espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme : *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*. Elles sont fréquemment isolées de broncho-pneumopathie aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépatobiliaires ou de pus divers.

Les espèces de *Klebsiella* sont : indole- (exception : *K. oxytoca*), ODC -, LDC + (exception : *K. rhinoscleromatis*), VP+ pour *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*, VP- pour *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*.

I.1.5.2. Enterobacter :

Le genre *Enterobacter* comprend 15 espèces ; *E. cloacae* et *E. aerogenes* sont les espèces les plus fréquemment isolées en cliniques. Ces bactéries peuvent être responsables de septicémies, de méningites, d'infections néonatales, d'infections urinaires, et de suppurations diverses et sont fréquemment impliqués dans les infections nosocomiales.

I.1.5.3. Serratia :

Ce genre comporte dix espèces : *S. marcescens*, *S. liquefactens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. odorifera* et *S. ficaria*, *S. grimesii*, *S. proteamaculans* et *S. entomophila*. *S. fonticola*. Ce sont des bactéries du milieu extérieur, elles se comportent comme des pathogènes opportunistes.

Serratia marcescens est l'espèce type et la plus fréquente du genre *Serratia*, cette bactérie produit un pigment (la prodigiosine) de coloration rouge violet (**Carbonnelle et al., 1987**),

I.1.6 Tribu des Proteae : « Entérobactérie TDA⁺ »

La tribu de *Proteae* comporte trois genres:

- Genre *Proteus*, 4 espèces : *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*.
- Genre *Providencia*, 4 espèces : *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri* et *P. rustigianii*
- Genre *Morganella*, une seule espèce : *M. morganii*.

C'est un groupe très hétérogène. Ces bactéries sont ONPG négatif, ne fermentent pas le lactose, mobiles (*P. mirabilis* et *P. vulgaris* sont abondamment flagellées et donnent sur milieu ordinaire un envahissement du milieu ou essaimage) (**Denis et al., 2007**)

I.1.7 Tribu des Yersiniae :

Le genre *Yersinia* comprend trois espèces sont pathogènes pour l'homme, *Y. pestis* : l'agent de la peste, maladie transmise du rongeur à l'homme par la morsure d'une puce (*Xenopsylla cheopis*), *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. Ces bactéries ont une croissance plus lente que celle des Entérobactéries (**Nauciel et Vilde, 2005**).

I.2 : Généralités sur les bacilles à Gram négatif non fermentaires(BGNF)

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont des bactéries aérobies strictes qui se développent habituellement sur milieu ordinaire et qui sont caractérisées par un mode de production énergétique ne faisant pas intervenir la fermentation (**Martin, 2007**).

I.2.1. Classification :

Une approche possible pour l'étude de ce vaste ensemble est de distinguer les espèces mobiles et les espèces immobiles :

- Pour les souches mobiles, observer l'arrangement des flagelles et leur position
- Pour les souches immobiles, distinguer les « oxydase positive » des « oxydase négative ».

Ainsi, par rapport aux groupes d'acide ribonucléique (ARN) ribosomal, dotés d'une mobilité et de la présence d'oxydase-(**Monteil, 2006**).

Les bacilles à Gram négatif non fermentaires sont à l'heure actuelle mieux classées grâce à de nombreuses études génétiques ADN-ADN ou ARN-ADN.

Nous pouvons distinguer un certain nombre de genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Kingella*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Bordetella*, *Flavobacterium* et *Sphingobacterium*. *Burkholderia cepacia*, et *Stenotrophomonas maltophilia* (**Berthelot et al., 2004**).

I.2.2. Habitat et pouvoir pathogène :

Les BGNF sont ubiquitaires. Elles sont isolées de l'environnement, de tractus digestif,...etc. Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales d'origine exogène (infections manuportées, infections sur matériel implanté) et d'origine endogène (flore cutanée, digestive) chez des patients les plus souvent immunodéprimés (**Denis et al., 2007**).

I.2.3. Le genre *Pseudomonas* :

Les bactéries du genre *Pseudomonas* constituant le genre type de cette famille sont des bacilles à Gram négatif mobiles et certains sont immobiles ; ils ne sont pas sporulés. Ce sont des chimio-organotrophe avec un métabolisme respiratoire strict. Elles sont oxydase positive (**Husson et al., 2007**). Il comprend des espèces fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putica*, *P. monteilii*, *P. chlororaphis*, etc) produisant de la pyoverdine et des espèces non fluorescentes (*P. alcaligenes*, *P. stutzeri*, *P. mendocina*) (**Denis et al., 2011**).

I.2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*:(bacilles pyocyanique ; du grec *puon* = pus ; *kuanos*= bleu foncé).*Pseudomonas aeruginosa* c'est l'espèce type du genre (**Michel-briand, 1993**). Il est parfois entouré d'une pseudo-capsule appelée « slime », qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie. Il peut être cultivé facilement sur tous les milieux en aérobiose.

Comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (**Khalilzadeh, 2009**). On peut noter également la production d'un voile fragile visqueux et peu épais à la surface des milieux liquides avec une odeur aromatique caractéristique (odeur de seringas). *P. aeruginosa* est capable de produire de nombreuses exoprotéines aux fonctions diverses : l'entérotoxine A, l'exotoxine A, l'exoenzyme S, la phospholipase (enzyme hydrolysant la lécithine), les protéases (**Jean, 2004**). Les caractères d'identification du *Pseudomonas aeruginosa* sont : oxydase(+), Indole -, urée -, TDA - (tryptophane-désaminase), H₂S -, gélatine +, ONPG - (orthonitrophényl-galactose), Nitrate-réductase +, LDC -, (Lysine-décarboxylase), ODC - (Ornithine-décarboxylase), ADH + (Arginine-deshydrogénase) (**Lie, 2002**). *P. aeruginosa* est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose (**Rossignol, 2007**).

I.2.4. Le genre *Acinetobacter*

Il y'a 32 espèces génomiques, dont 17 Avec un nom validé. Seulement 10 espèces ont été isolées dans des échantillons humains

(*A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. parvus*, *A. radioresistens*, *schindleri* *A. et A. ursingii*), et 7 espèces nouvellement décrites ont été isolées de boues activées (*A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae* et *A. townneri*) (**Dortet, 2006**).

I.2.4.1. *Acinetobacter baumannii*

Elle est considérée comme une bactérie ubiquiste ayant pour principal habitat le sol, les eaux, les végétaux, et des animaux. Chez l'homme, elle peut coloniser la peau, les plaies et les tractus aériens et digestifs. L'espèce est une coccobacille à Gram négatif, généralement regroupé en deux ou en chainettes de longueur variable, ne fermente pas le glucose, immobile, catalase positif et oxydase négative (**Van et al., 2004**).

Acinetobacter baumannii est responsable de 5 à 10 % des infections nosocomiales dans des services accueillant des patients fragilisés, notamment les services de soins intensifs et de réanimation. On observe surtout des infections pulmonaires chez des patients sous ventilation assistée, des infections urinaires sur sonde et des infections liées aux cathéters avec le risque de septicémie. (**Laure et al., 2004**).

I.3. Autres bacilles à Gram négatif :

❖ *Pasteurella* :

Les *Pasteurella* sont des petits bacilles à Gram négatif à coloration habituellement bipolaire qui ont une forme allant de coccobacilles à des aspects plus longs.

Elles sont des bactéries immobiles, aéro-anaérobie, oxydase (+), catalase (+). La température de croissance optimale est de 37°C. Quatre espèces sont principalement impliquées en pathologie humaine : *P.multicoda*, *P. dogmatis*, *P. canis*, *P. stomatis*. Les *Pasteurella* sont des bactéries commensales du rhinopharynx de nombreux animaux notamment de mammifères et des oiseaux.

L'infection se fait suite d'une griffe du chat ou chien. La forme aigue est caractérisée par la brièveté de l'incubation, avec des douleurs très vives et l'inflammation de plaie. On peut observer aussi des septicémies, des endocardites, des formes pleuro-pulmonaire, des méningites et des manifestations divers purulentes. (Denis et al., 2007).

II. Les antibiotiques :

II.1 Définition des antibiotiques :

Les antibiotiques (du grec *anti* : contre, *bios* : vie) sont des dérivés chimiques élaborés par des microorganismes vivants. Ces substances capables d'agir sur les microorganismes tout en étant dépourvues de pouvoir toxique, ont été découvertes.

On dit que les antibiotiques sont

- Bactériostatique lorsqu'elles possèdent la propriété d'inhiber momentanément la multiplication des bactéries dans des conditions d'emploi définies
- Bactéricide : lorsqu'elles détruisent totalement les bactéries (Prescott et al., 2003), (Meyer et al., 2004), (Courvalin et al., 2012).

II.2 Classification des antibiotiques

Certaines classifications se sont fondées sur :

- Le spectre d'activité : antibiotique à large spectre ou à spectre étroite
- Le site d'action : paroi, membrane, acide nucléique, protéines...etc.)
- La composition chimique : c'est la classification le plus souvent en usage dont les antibiotiques sont regroupés en familles. (Meyer et al., 2004),

II.2.1 Antibiotiques actifs sur la paroi bactérienne :

II.2.1.1 Les β lactamines :

- Structure chimique

Possèdent un cycle B-lactame dans leur structure chimique. En fonction de l'hétérocycle associé au cycle B-lactame, on distingue les pénicillines (pénicilline G, pénicilline M, pénicilline A, pénicilline V), les céphalosporines (1^e 2^e 3^e 4^e génération), les carbapénems, et les monobactames. (**Andre et al., 1998**). (Tableau 7)

- Mode d'action des β lactamines :

Les β lactamines agissent sur la synthèse du peptidoglycane en inhibant les protéines liant la pénicilline (PLP) par l'inhibition de la formation des ponts penta cycliques responsables de la structure réticulée de la paroi. On obtient ainsi des formes bizarroïdes (rondes ou filamenteuses) qui aboutissent à la lyse bactérienne (**Grappin et al., 1998**)

II.2.1.2 Fosfomycine :

Spectre d'activité : *Entérobactéries*, *Pasteurella* et *Pseudomonas aeruginosa*. Elles sont inactifs sur : *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morgagni*.

Mode d'action : elle agit au début de la synthèse de peptidoglycane dans la phase cytoplasmique par inhibition d'un enzyme clef de la synthèse du précurseur (pyruvyl transférase), cette inhibition se fait par analogie de structure de la fosfomycine avec le substrat de l'enzyme. (**Cattoir, 2006**).

II.2.2 Antibiotiques actif sur la membrane cytoplasmique :

- **Polymixine** : Ils possèdent une charge positive et agissent comme des agents tensio-actifs. Ils agissent sur la membrane cellulaire en se fixant sur les phospholipides d'où rupture de la barrière osmotique Le spectre antibactérien des polymixines est limité aux bactéries à Gram négatif aérobies : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Entérobactéries* (à l'exception des *Proteus spp*, *Morganella morgannii*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.*). (**Cattoir, 2006**).

Tableau6 : Classification et spectre d'activité des β lactamines (François et al.,2003), (Nauciel et Vilde, 2005),(Courvalin et al.,2012).

Groupe	Sous groupe	Antibiotiques (DCI)	Spectre d'activité
Pénicilline	Pénicilline G et ses dérivés	-Benzyl Pénicilline (Parentérales) - Phénoxy méthylpénicilline (pénicilline V) Orales)	Inactif sur les <i>entérobactéries</i> et les <i>Pseudomonas</i> et <i>Acinetobacter</i>
	Pénicilline M	Méthicilline, Cloxacilline	Inactif sur les <i>Entérobactéries</i> et les <i>Pseudomonas</i> et <i>Acinetobacter</i>
	Aminopénicillines (pénicillines à large spectre	Amoxicilline Ampicilline	<i>Entérobactéries</i> sauf : <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> Et <i>Proteus</i> indole+. Inactif sur les <i>Pseudomonas</i> et les <i>Acinetobacter</i>
	Carboxy-pénicillines	- Carbénicilline, Ticarcilline	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . -Bacilles à Gram- résistants à l'ampicilline. - <i>Entérobactéries</i> productrices de céphalosporinases : <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Proteus</i> indole+.
	Acyl-amino-pénicillines (Uréido-pénicillines)	Azlocilline - Mezlocilline - Pipéracilline	<i>Entérobactéries</i> productrices de céphalosporinases. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i>
	Pénicillines sulfones : inhibiteurs de β lactamases utilisées en association avec une β lactamine	Ampicilline+Sulbactam Pipéracilline+Tazobactam	Bactéries à Gram- fermentaires Bactéries à Gram- oxydatifs
Céphèmes : sont classés selon leur activité antibactérienne en générations	Céphalosporines de la première génération	Céfaloridine, Céfazoline	Certains bacilles à Gram - (<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>salmonella</i>) -Inactifs sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Céphalosporines de 2 ^{ème} génération	Céfoxitine (Céfamycine) Céfuroxime, Céfamandole	-Bacilles à Gram- -Inactifs sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Céphalosporines de 3 ^{ème} génération	Céfotaxime, Céftrizidime	Bacilles à Gram- Certains sont actifs sur <i>Pseudomonas</i>
	Céphalosporines de 4 ^{ème} génération	Céfopérazone	<i>Pseudomonas</i> , <i>Entérobactéries</i> , <i>Acinetobacter</i>
Carbapénèmes		Imipénème, Méropénème	Bactéries à Gram- y compris <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Monobactames		Aztréonam	Actif uniquement sur les bacilles à Gram-y compris <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Association pénicillines et inhibiteurs de β lactamase		Amoxicilline+Acide clavulanique Ticarcilline + Acide clavulanique	actives sur : les <i>entérobactéries</i> (Amoxicilline+Acide clavulanique) et sur les bacilles à Gram négatif non fermentaire (Ticarcilline + Acide clavulanique)

II.2.3: Antibiotiques actif sur la synthèse des protéines :

II.2.3.1 Les aminosides : est un antibiotique bactéricide à spectre large. Ils sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines qui exercent des effets pléiotropes sur la bactérie. Ils inhibent la traduction aux stades d'initiation, d'élongation et de terminaison. Leur cible est la sous unité 30S du ribosome. Ils sont actifs sur les cocci et bacilles à Gram+, cocci et bacilles à Gram-, sur *Mycobactéries* (streptomycine, kanamycine) et sur les anaérobies et les *streptocoques* sont résistants (**Lambert, 2012**).

II.2.3.2 Les tétracyclines : c'est un antibiotique bactériostatique à large spectre ; ils actifs sur les *Enterobacter* et *Acinetobacter baumannii* ; sur les bactéries à multiplication intracellulaire comme : *Pasteurella*, et sont inactifs sur *Pseudomonas aeruginosa*. Ces antibiotiques agissent sur la sous unité 30S de ribosome en inhibant la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique, ainsi ils empêchent la fixation de l'aminoacyl-ARNt (**Tazi et Poyart, 2012**)

II.2.3.3 Phénicolés : Le chloramphénicol et le thiamphénicol sont les deux seuls représentants de cette classe thérapeutique. Les phénicolés ont un spectre large comprenant la plupart des cocci à Gram négatif, des bacilles à Gram négatif, des anaérobies et des germes intracellulaires. Le chloramphénicol et le thiamphénicol se fixent préférentiellement sur le site A au niveau de la sous-unité 50S. L'action des phénicolés est bactériostatique. (**Yala et al., 2001**)

II.2.4: Antibiotiques actifs sur l'ADN :

II.2.4.1 Les quinolones et les Fluoroquinolones : les fluoroquinolones ont un spectre d'activité plus étendu que les quinolones ; ils sont actifs sur les Entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Ces antibiotiques inhibent sélectivement la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes impliqués dans cette synthèse: l'ADN gyrase et l'ADN topo- isomérase IV (**Brysqvier, 1999**).

II.2.4.2 Rifamycines : cette classe est représentée par : Rifamycine et Rifamycine SV. Ces antibiotiques ont une action bactéricide sur les : *Mycobactéries* ; Bactéries à Gram+ à développement cellulaire ; divers bacilles à Gram négatif dont *Brucella*. En inhibant la transcription de l'ADN en ARN messenger par l'inhibition de l'ARN polymérase (**Courvalin et al., 2012**).

III. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques :

III.1 : La résistance

Une bactérie dite « résistante » lorsqu'elle se développe en présence d'une concentration d'antibiotique, qui habituellement, inhibe sa croissance.

Dans un contexte clinique, l'antibiorésistance se définit comme la réduction de l'efficacité des traitements de façon à ce que la santé des patients ainsi que la santé publique soit compromises (Felissa et al., 2007).

III.1.1 La résistance naturelle

La résistance naturelle, appelée aussi résistance intrinsèque, est une caractéristique propre d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Portée par les chromosomes, elle est stable, et transmise à la descendance. Elle constitue un caractère d'identification des bactéries et détermine le phénotype « sauvage » des bactéries. Les Entérobactéries produisent naturellement diverses β -lactamases ce qui permet de les classer en six groupes phénotypiques de résistance (Tableau 7). La résistance naturelle chez les *Pseudomonas aeruginosa* est liée à 2 mécanismes : la production inductible d'une céphalosporinase chromosomique et une mauvaise perméabilité membranaire. Le phénotype sauvage est sensible aux : carboxypénicillines (ticarcilline), uréido-pénicillines (pipéracilline), monobactame (aztréonam), carbapénèmes (imipénème), à certaines céphalosporines de troisième génération (céftazidime, céfépime) (Mesaros et al., 2007). Les souches sauvages d'*Acinetobacter* sont résistantes naturellement à la pénicilline G. l'*Acinetobacter baumannii* est considéré comme l'un des bacilles à Gram négatif les plus résistants à l'ensemble des antibiotiques (Dominique, 2012).

III.1.2 La résistance acquise

La résistance acquise ne concerne que certaines souches bactériennes au sein d'une espèce donnée. Variable dans le temps et dans l'espace. Elle s'acquière soit par mutation sur un chromosome, soit par l'acquisition de gènes extra-chromosomiques lors des transferts génétiques (plasmides, intégrons, transposons). La résistance acquise peut se transmettre d'une génération à une autre (transmission verticale) et parfois entre des espèces différentes (transmission horizontale). La résistance acquise se propage de façon importante, elle peut toucher plusieurs familles d'antibiotiques en même temps (Nauciel et Vilde, 2005).

La résistance acquise chez les entérobactéries est représentée dans le tableau 9. La résistance acquise des *Pseudomonas aeruginosa* est soit enzymatique (pénicillinase constitutives plasmidiques; céphalosporinase constitutives chromosomiques ; β lactamase à spectre étendu) ou par système d'efflux pouvant toucher différentes classes d'antibiotiques (Husson et al., 2007).

Différents mécanismes de résistance aux β -lactamines ont été signalés et identifiés chez *Acinetobacter baumannii* liés principalement à la production de β -lactamases. *Acinetobacter baumannii* produit naturellement une céphalosporinase de type AmpC qui est normalement exprimé à bas niveau, et ne diminue pas l'efficacité des céphalosporines à large spectre (Céphalotine) ou des carbapénems (Dominique, 2012).

III.2: Les mécanismes de résistance bactérienne

Les bactéries ont su développer des mécanismes divers et variés afin d'inhiber l'action des antibiotiques utilisés en thérapeutique.

Les principaux mécanismes élucidés à ce jour sont l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique, la diminution de la perméabilité de la paroi bactérienne, et la mise en place ou la multiplication de systèmes d'efflux. Une même souche bactérienne peut cumuler plusieurs de ces mécanismes.

III.2.1 Modification de la cible d'action des antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques peut résulter de mutations spontanées qui, introduisant des substitutions d'acides aminés ou des bases nucléiques dans les cibles moléculaires leur font perdre leur affinité pour les agents inhibiteurs. De nombreux exemples de ce type de mécanismes ont été rapportés dans la littérature pour différentes familles d'antibiotiques.

- **Ribosomes** : le phénomène ne peut apparaître facilement que lorsque la cible est codée par un gène se trouvant en une seule, voir deux copies dans le chromosome. Des mutations isolées affectant les gènes de structure des ARN 16S et 23S ne peuvent donc pas aboutir à une résistance significative aux inhibiteurs ribosomiaux que chez les espèces ayant un faible nombre de copie de ces gènes car les altérations sont récessives par rapport aux allèles sauvages.
- **Altération de la synthèse des acides nucléiques** : les altérations de la cible ADN gyrase par une substitution d'acides nucléiques entraînant une résistance aux quinolones, la modification des enzymes impliquées dans la synthèse des folates ainsi que l'ARN polymérase confère une résistance respectivement aux sulfamides et à la rifamycine (Nauciel et Vilde, 2005).

III.2.2 Diminution de la perméabilité membranaire :

A l'exception des polymyxines et peut être des aminosides, les antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif traversent la membrane externe par diffusion passive à travers les porines. La diminution quantitative ou des modifications dans la région de construction interne de ces canaux protéiques peuvent freiner la pénétration intracellulaire des agents antibactériens et conférer, de ce fait, un niveau bas de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques (Brysquier, 1999).

III.2.3 Résistance aux antibiotiques par inactivation enzymatique

Certaines bactéries vont produire des enzymes (les pénicillinases plasmidiques ; les pénicillinases chromosomiques ; les céphalosporinases, Les β - lactamases à spectre étendu (BLSE) capables de modifier ou de détruire un antibiotique), conduisant à son inactivité. Les principales familles

d'antibiotiques concernées sont les β -lactamines, les aminosides, la famille des macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) et les phénicolés.

III.2.4 Résistance aux antibiotiques par efflux :

Ce phénomène est surtout décrit chez les Entérobactéries; il se manifeste par l'existence chez ces bactéries de systèmes qui leur permettent d'excréter des antibiotiques, leur conférant une résistance naturelle. Cependant, la survenue de mutations sur ces systèmes, peut augmenter leur expression, donnant naissance à une résistance acquise pouvant toucher simultanément plusieurs familles d'antibiotiques (**Courvalin et al., 2012**).

Tableau7 : le phénotype de résistante naturelle des Entérobactéries (Bonnet, 2012).

groupe	Phénotype	Espèces appartenant au phénotype
0	« sensible » d'espèces dépourvues de gènes B lactamase	<i>P. mirabilis</i> <i>Salmonella spp</i>
1	« sensible » d'espèces produisant naturellement une céphalosporinase de classe C	<i>E. coli</i> <i>Shigella spp.</i>
2	« pénicillinase bas niveau »	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K.oxytoca</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>C.amalonicus</i> et <i>E. coli</i>
3	« céphalosporinase de bas niveau »	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Morganella morgannii</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>P.rettgeri</i> et <i>Pantoea agglomerans</i> .
4	Céphalosporinase inducible de classe C et une enzyme de classe A	<i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Serratia fonticola</i> .
5	« céfuroximase »	<i>P. vulgaris</i> <i>P. penneri</i>
6	B-lactamase à spectre étendu chromosomique »	<i>Kluyvera ascorbata</i> , <i>K. georgiana</i> , <i>K. cryocrescens</i> , <i>Citrobacter sedlakii</i> et <i>Erwinia persicina</i>

Tableau8 : Phénotype de résistance « pénicillinase acquise » des Entérobactéries (Bonnet, 2012).

Antibiotique	Phénotype « pénicillinase acquise » du groupe		
	0et 1	2	3 et5
Aminopénicillines	R	R	R
Aminopenicillines+ clavulanate	S /I/R	S /I/R	R ^a
Carboxypénicillines	R(S →R/I) ^b	R	R
Carboxypénicillines + clavulanate	S/I(R)	S/I(R)	S/I(R)
Uréidopénicillines	S →/I/R	I/R	I/R
Uréidopénicillines+ tazobactam	S/I	S/I	S/I
C1G ^e	S/I/R	S/I/R	R
C2G ^e	S	S(I)	S/I/R ^d
C3G ^e	S	S	S/I/R ^d
Céfoxime	S	S	S
C4G ^e	S	S	S
carbapénèmes	S	S	S

S/I/R pour les espèces *P. vulgaris* et *P. penneri*

()^b. résultat rarement observé

La flèche indique l'interprétation préconisée.

^d résultat fonction de l'espèce et de l'isolat.

Sur une période de 4 mois (12 mars 2014- 17 juillet 2014) 1701 prélèvements différents ont été acheminés au laboratoire central, unité bactériologie d'EPH Fares Yahia de Kolea, pour isoler et identifier des bacilles Gram négatif et déterminer leur sensibilité aux antibiotiques testés.

I. Matériel :

I.1: Matériel non biologique et appareillage : (voir Annexe 1 et 2)

I.2: Matériel biologique :

Le matériel biologique est représenté par les différents prélèvements étudiés : urines, sang, pus (cutané, d'oreilles, et de gorge), liquide de ponction (liquide pleural) (Tableau 9). Chaque prélèvement est accompagné d'une fiche de renseignements sur laquelle sont mentionnées les coordonnées du malade (nom, prénom, âge, sexe, les signes cliniques ayant motivé le prélèvement et l'éventuelle antibiothérapie en précisant la nature de l'antibiotique, service clinique dans le cas d'une hospitalisation, médecin traitant ...)

Tableau 9 : l'origine et le nombre de prélèvements.

L'origine de prélèvement	Urine	Pus	Sang	Liquide de ponction	Prélèvement de vaginales	Totale
Maladies internes		4	6	10		20
Chirurgie		14	6	2		22
Pédiatrie		2	22			24
Néphrologie			8	4		12
Gynécologie		1	1		1	3
Réanimation		2	1	2		5
Maladies infectieuses		7	13	9		29
UMC		1	13	3		17
Externes	1523	15	1	2	28	1569
Nombre de prélèvements	1523	46	71	32	29	1701

II. Méthodes :

Après la réception des prélèvements au niveau de laboratoire centrale de l'EPH Fares Yahia. Nous procédons à l'examen microbiologique.

II .1. Examen microbiologique des différents prélèvements:

L'examen microbiologique de tout prélèvement comporte :

- Un examen macroscopique.
- Un examen direct : un état frais ou une coloration.
- Mise en culture du prélèvement.
- Isolement et identification des bactéries.
- Etude de sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées.

Toute infection bactérienne s'accompagne, outre la présence de bactéries, de signes biologiques liés à l'inflammation avec l'éventuelle présence de leucocytes, notamment de polynucléaires. Ces éléments peuvent entraîner au-delà d'un seuil, une modification visuelle, clairement perceptible à l'œil nu, qui signe une anomalie patente. Divers éléments sont alors obtenus : clair, trouble, hématurique,

Le tableau 10 représente l'examen direct et la mis en culture de chaque prélèvements pathologiques

Tableau 10 : l'examen direct et la mis en culture des prélèvements

Examen direct prélèvement	Etat frais	Coloration	Mis en culture
Urine	La présence des germes, des cristaux, des levures...		<ul style="list-style-type: none"> - Dilution selon la méthode de Kass - Ensemencement sur gélose nutritive - Incubation à 37° C /24h
Pus		<ul style="list-style-type: none"> - Coloration au bleu de méthylène : la quantité des polynucléaire et la présence des bactéries. 	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencement sur : gélose nutritive, Héctoène, Chapman, gélose au sang frais et cuit. - Incubation à 37°C/24h
Pertes vaginal	Présences des cellules épithéliales, les polynucléaires, les levures, les trichomonas vaginalis	Coloration de Gram : la présence de la flore de Doderlein et les Clue cells (Gardnerella vaginalis)	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencement sur : gélose nutritive, Héctoène, Chapman, gélose au sang frais et cuit. - Incubation à 37°C/24h-48h
Sang		Coloration de Gram : la présence des bactéries	<ul style="list-style-type: none"> - des repiquages systématiques sont réalisés après 24 heures d'incubation, au 3^{ème} jour et au 10^{ème} jour - Ensemencement sur : gélose nutritive, Héctoène, Chapman, gélose au sang frais et cuit. - Incubation à 37°C/24h-
Liquide pleural	Numération des globules blancs	Coloration au bleu de méthylène : l'équilibre leucocytaire	<ul style="list-style-type: none"> - Ensemencement sur : gélose nutritive, Héctoène, Chapman, gélose au sang frais et cuit. - Incubation à 37°C/24h-

- Si la culture est positive, on procède à l'identification des bactéries isolées

II.2. Identification des germes isolés : la culture peut être polymicrobienne (plusieurs types de colonies) dans ce cas on procède à la purification des différentes colonies isolées. Si la culture est monomicrobienne on procède à l'identification des colonies. Le diagramme suivant résume les différentes étapes d'identification des cultures bactériennes positives (figure1).

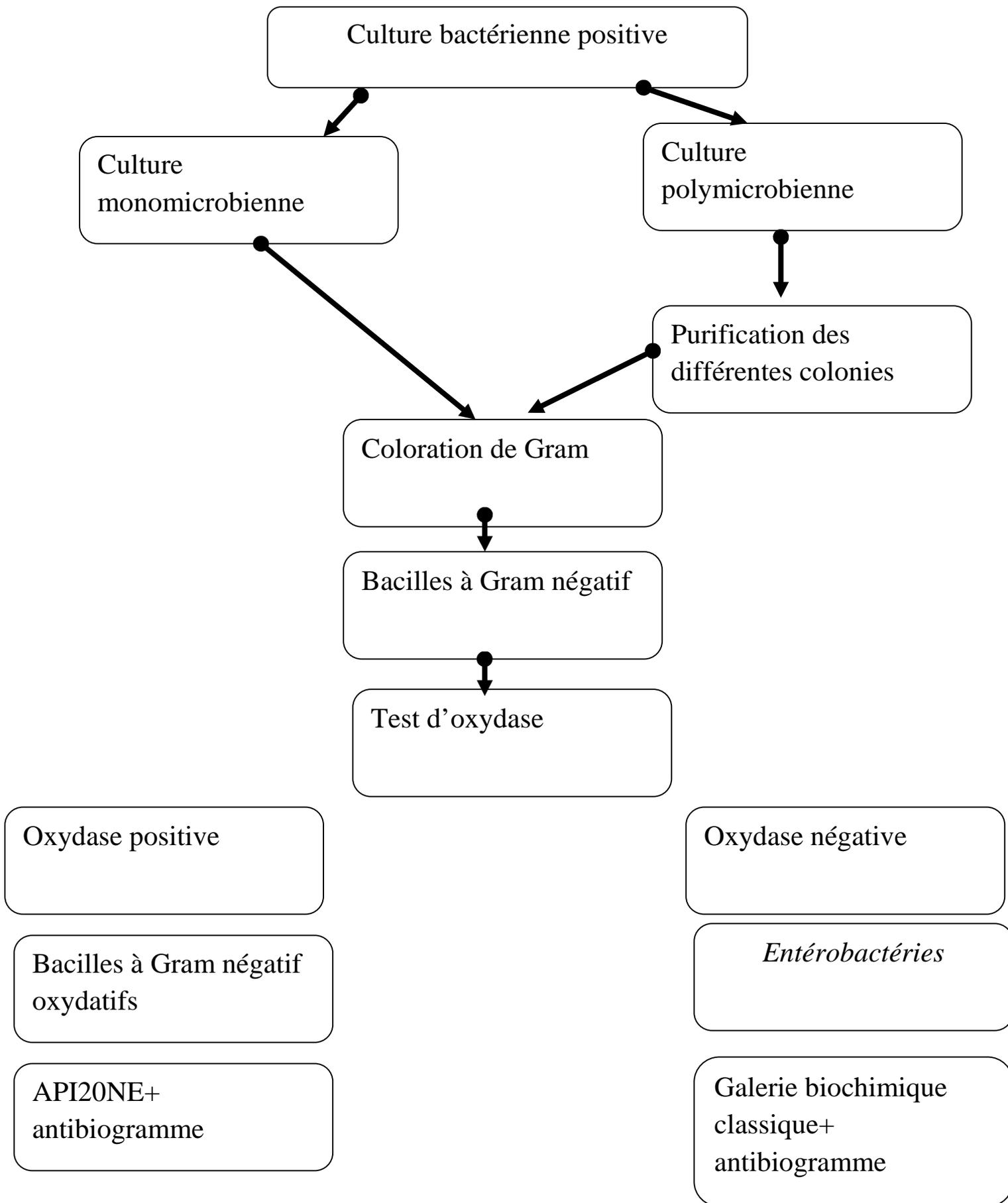


Figure 1 : les différents étapes d'identification des bactéries isolées

II.2.1. Examen macroscopique : l'aspect des colonies, l'odeur, la taille, parfois la pigmentation des colonies ce sont tous des critères d'orientation pour l'identification bactérienne.

II.2.2. Examen microscopique

■ Etat frais

● Technique

Cette préparation consiste à examiner les microorganismes vivants entre lame et lamelle. Une goutte de suspension bactérienne est déposée au centre de la lame, puis déposer une lamelle au-dessous en évitant de créer les bulles d'air.

L'observation se fait par microscope optique aux grossissements x 10 et x 40

● Résultat

L'examen direct à l'état frais permet d'apprécier la morphologie des bactérie, leur abondance et ainsi que leur mobilité.

■ Coloration de Gram

C'est la coloration de base en Bactériologie et elle permet une classification des bactéries selon leur composition chimique. La coloration permet de distinguer les bactéries Gram négatif des bactéries Gram positif, leur morphologie : cocci, bacille ou coccobacille ainsi que leur mode de regroupement.

● Technique :

La coloration de Gram comporte plusieurs étapes successives :

- Préparation du frotti : le prélèvement est réalisé par une pipette pasteur ou une anse de platine. Déposer quelques gouttes d'une suspension sur une lame propre et l'étaler de centre à la périphérie et laisser sécher.
- Fixation : Elle peut se faire par la chaleur ou l'alcool-éther
- Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane et laisser agir une minute à 5min/en fonction de la concentration de la colorant.
- Rejeter le colorant et recouvrir la préparation avec de lugol, laisser agir 30 secondes.
- Rejeter le lugol puis rincer à l'eau.
- Décolorer à l'alcool 95° pendant 30 secondes.
- Rincer à l'eau courante et recouvrir la lame avec la fuchsine diluée, laisser agir une minute.

- Rejeter la fuchsine, laver abondamment, égoutter et sécher entre deux feuilles de papier buvard propres.

- **Lecture**

La lecture se fait à l'objectif x100 en ajoutant de l'huile à immersion, les bactéries à Gram positif se colorent en violet et les bactéries à Gram négatif se colorent en rose.

II.2.3 .Les méthodes classiques d'identification des bactéries :

II.2.3.1 Etude pratique du métabolisme énergétique :

A. Etude des enzymes respiratoire

a. La recherche de la catalase :

- **Principe**

Au cours de la respiration aérobie, il y a production de H_2O_2 qui est toxique pour la bactérie, celle-ci le dégrade grâce à deux enzymes la peroxydase et la catalase, selon les réactions suivantes :



- **Technique**

Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée. Prélever à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur un fragment de colonie et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

- **Résultat :**

La présence de catalase se manifeste par une production de bulles d'air.

b. Recherche de l'oxydase :

- **Principe**

Au cours de la respiration aérobie, l'accepteur final de la chaîne de transport d'électrons est une enzyme dite : cytochrome oxydase ou cytochrome aa₃. La mise en évidence de celle-ci ne peut se faire que si la bactérie a un cytochrome c.

- **Technique :** la mise en évidence d'oxydase est effectuée à l'aide d'un disque imprégné d'une solution aqueuse à 1% de N-tétraméthylparaphénylène diamine. La crème bactérienne est déposée sur le disque à l'aide d'une pipette Pasteur.

- **Résultats**

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette à l'endroit où on a déposé la colonie, soit immédiatement ou non.

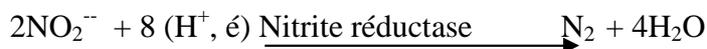
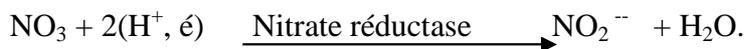
En fonction du délai d'apparition de la coloration, on a :

- *Entérobactéries* (test négatif)

- *Acinetobacter* (test négatif)
- *Pseudomonas aeruginosa* (test positif après 20 à 30 secondes)

c. Recherche du nitrate réductase :

- **Principe :** Certaines bactéries peuvent utiliser comme accepteur final d'électrons des composés minéraux riches en oxygène (respiration anaérobie). C'est le cas en particulier des nitrates qui sont alors réduits en nitrites. La réduction peut aller au-delà du stade nitrites et conduire à la formation d'azote gazeux (N₂)



La présence est alors déterminée à l'aide des réactifs de GRIESS-ILOSWAY : Acide Sulfanilique et Alpha Naphatylamine.

- **Technique :**

On ensemence quelques gouttes de la suspension bactérienne dans un bouillon nitrate après 24 Heures d'incubation on ajoute une ou deux gouttes d'acide sulfanilique en milieu acétique (réactif NIT₁) puis une à deux gouttes d'alpha-naphtylamine en milieu acétique (réactif NIT₂).

- **Lecture :**

- Si la coloration rose apparaît : la bactérie possède la Nitrate réductase.
- Si le bouillon reste incolore : \longrightarrow Soit les nitrates n'ont pas été réduits.
Ou bien ils ont été transformés en Nitrites puis en Azote.

L'addition d'un réducteur comme la poudre de Zinc permet de différencier ces 2 voies :

- Si le bouillon devient rose : les Nitrates sont présents : La bactérie ne possède pas la Nitrate réductase.
- Si le milieu reste tel incolore: Les nitrates ont été réduits en Nitrites puis en azote ammoniacal : La bactérie possède la Nitrate réductase.

B. Etude de la voie fermentaire utilisée :

- **Principe :** Le milieu utilisé est celui de CLARK et LUBS qui permet de mettre en évidence 2 voies de dégradation de l'Acide pyruvique :
 - la voie Butylène –Glycol : identifiée indirectement par la recherche du métabolite intermédiaire, l'Acétoïne. Ce métabolite en présence de KOH est oxydé en diacétyl qui peut réagir avec l'alpha naphthol pour donner un complexe de coloration rose-rouge. (le test du voges proskauer) (VP).
 - La voie des acides mixtes : est étudiée par le test du rouge de méthyle (réaction RM)
- **Technique :**
 - On ensemence quelques gouttes de la suspension bactérienne dans le bouillon Clark et Lubs, après une incubation de 24 heures à 37 °C on divise le bouillon dans deux tubes, dans un tube on ajoute quelques gouttes de KOH (réactif VP₁) et quelques gouttes d'alpha-naphthol (réactif VP₂). Dans le deuxième tube on ajoute quelques gouttes du réactif RM.
- **Lecture :**

Réaction VP :

- Si une coloration rouge violacée apparaît: la réaction est VP +.
- Si le bouillon reste incolore : la réaction est VP-.

Réaction RM :

- Si le milieu prend une coloration rouge: la réaction est RM +.
- Si le milieu reste jaune, son pH est 6 : la réaction est RM -.

C. Etude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone :**• Principe**

Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et de sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol. Une utilisation du citrate se traduit par une culture sur la gélose et la plus souvent cette croissance s'accompagne d'une libération d'ammoniaque à partir des sels d'ammonium ce qui se traduit par un virage du bleu de bromothymol au bleu.

• Technique :

- A partir d'une colonie, on ensemence le milieu en surface par des stries serrées uniquement la partie inférieure, la partie supérieure servira comme témoin.

- Incubation à 37°C pendant 24 h.

- **Lecture :**

- Si le milieu de culture vire au bleu : citrate de Simmons positif la bactérie utilise le citrate.

- Si le milieu reste vert : citrate de Simmons négatif ; la bactérie soit n'utilise pas le citrate ou bien n'a pas la perméase nécessaire à la pénétration du citrate dans le cytoplasme pour sa dégradation.

II.2.3.2. Etude du métabolisme glucidique :

a. Etude de la dégradation des sucres :

- **Principe :** Cette réaction est réalisée sur milieu T.S.I. (Tri Sugar-Agar) : Ce milieu se présente en pente et en culot et permet de mettre en évidence cinq caractères.

- la fermentation du glucose qui se traduit par virage au jaune du milieu qui était rouge à l'origine (culot) ;

- la fermentation du lactose et saccharose sur la pente qui se traduit également par virage au jaune ;

- la présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air ;

- la production de H₂S qui se traduit par une coloration noire.

- **Technique :**

- ce milieu est ensemencé avec la souche étudiée en effectuant des stries à la surface de la pente de la gélose puis le culot est ensemencé par pique centrale. On desserre le bouchon.

- On incube le milieu à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture :**

- Si le culot vire au jaune, la bactérie a fermenté le glucose.

- Si le culot reste rouge, la bactérie ne fermente pas le glucose

- Si la pente vire au jaune : la bactérie a dégradé le lactose et le saccharose.

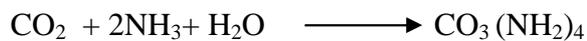
- Si la pente reste rouge : la bactérie a dégradé le lactose et le saccharose.

- Si le milieu noircit: la bactérie est H₂S⁺.

- Si on a un décollement de la gélose ou présence des bulles de gaz sur la paroi interne du tube : la bactérie fermente le glucose avec dégagement de gaz.

II.2.3.3 : Métabolisme protidique :**A-Recherche de l'uréase, tryptophanase, tryptophane désaminase (TDA)**

- **Principe** : la recherche de ces enzymes se fait sur milieu de Ferguson, appelé aussi : milieu à l'urée, milieu urée-indole.
- L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu. selon la réaction suivante :



- Le tryptophane désaminase désamine le tryptophane pour donner de l'acide indole-pyruvique. En présence de perchlorure de fer et en milieu acide (réactif TDA), l'acide indole-pyruvique donne un composé de couleur brune foncée (presque noire).
- Certaines bactéries désaminent puis hydrolysent le tryptophane pour donner une molécule d'indole. L'indole réagit avec la fonction aldéhyde du paradiméthylaminobenzaldéhyde pour donner un composé coloré en rouge.
- **Technique** le milieu FERGUSON estensemencé par les colonies bactériennes isolées.
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

- Uréase positive : le milieu présente une coloration rouge violacée ou orange foncée.
- Uréase négative : le milieu a une teinte jaune

Ajouter une goutte du réactif TDA.

- Apparition d'une coloration brune foncée : bactérie TDA positive.
- Apparition d'une coloration jaune : bactérie ne produisant pas de tryptophane désaminase.

Ajouter une goutte du réactif de Kovacs

- Indole positif : apparition d'un anneau rouge
- Indole négatif : milieu incolore.

B-décarboxylases :**• Principe :**

La recherche des décarboxylases se fait sur milieu Moeller-falkow : milieu liquide contenant du glucose, l'acide aminé étudié (arginine, lysine ou ornithine) et un indicateur coloré le pourpre de bromocrésol. Pour chaque test de recherche des décarboxylases, on utilise un milieu témoin sans acides aminés. Dans le 1^{er} temps, la bactérie utilise le glucose du milieu qui s'acidifie et fait virer l'indicateur au jaune. Dans un 2^{ème} temps, la décarboxylation de l'acide aminé alcalinise le milieu et refait virer l'indicateur au bleu violacé, alors que le tube témoin reste jaune.

• Technique

On ensemence chacun des quatre tubes avec une suspension bactérienne.

On recouvre la surface du milieu d'huile de paraffine. Pour réaliser l'anaérobiose

On incube les tubes à l'étuve à 37°C pendant 24heures.

• Lecture :

Pour valider la lecture : le témoin doit virer au jaune

- Si le tube contenant l'acide aminé est de coloration violette : la réaction est positive.
- Si le tube contenant l'acide aminé est de coloration jaune : la réaction est négative

II.2.4. Identification par les systèmes d'API:**❖ API20E**

API20E est un système standardisé pour l'identification des *Entérobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données

❖ API20NE :

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Pasteurella*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

Principe

La galerie API 20 (E ou NE) comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne saline 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.

MODE OPERATOIRE :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.
- A l'aide d'une pipette prélever quelques colonies bien isolés et de morphologie identique, on utilise préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne trouble (et d'opacité égale à 0,5 de Mc Farland pour la NE)
- Les tubes et les cupules de la galerie sont remplis par la suspension bactérienne préparée à l'aide d'une pipette.
- Les sucres de L'API20NE sont remplis par la suspension bactérienne enrichis dans l'API AUX medium
- Lorsque le sigle du test est encadré, on remplit le tube et la cupule par la suspension bactérienne.
- Lorsque le sigle du test est souligné on remplit uniquement le tube.
et la cupule sera secondairement remplie d'huile de paraffine.
- Lorsque le sigle du test n'est ni encadré ni souligné on remplit uniquement le tube.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber l'API20E $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures et l'API20NE à $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures (± 2 heures)

Lecture et interprétation

L'identification est obtenue à partir d'un profil numérique

- Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou 4) est indiquée pour chaque test. Additionner à l'intérieur de chaque triplet les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de sept chiffres qui sert de code d'identification. la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.
- le profil numérique est recherché dans un catalogue analytique ou à l'aide d'un logiciel d'identification

II.3. Etude de sensibilité aux antibiotiques :

II.3.1-Antibiogramme par diffusion des disques

La décision de prescrire un antibiotique doit être fondée sur les données de l'examen clinique et les résultats de l'examen bactériologique, notamment d'un antibiogramme effectué sur la ou les bactéries incriminées dans l'infection.

L'antibiogramme est une technique de laboratoire qui détermine la sensibilité d'une bactérie à l'égard des antibiotiques. La méthode la plus employée est celle de la diffusion en gélose qui peut se faire simultanément avec plusieurs disques contenant des antibiotiques différents. Le résultat de l'antibiogramme indique si la souche est sensible, intermédiaire ou résistante aux antibiotiques testés.

1. Technique

▪ Milieu pour antibiogramme :

-Gélose Mueller Hinton coulé en boîtes de Pétri 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 heures 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.

- La suspension bactérienne à 0,5 MF doit être diluée au 1/10 dans le cas où l'on teste des molécules à charge SFM (c'est-à-dire des antibiotiques pour lesquels il n'existe pas encore de critères d'interprétation dans la technique CLSI).

▪ Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.

- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de le 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 Pétri, 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 d'une pince bactériologique stérile, ne pas déplacer les disques après application.
- Les boîtes d'antibiogramme sont incubées à 37°C en atmosphère normale pendant 24 heures.

Selon les souches isolées il y a des antibiotiques spécifiques à tester, le tableau 10 regroupe les différents antibiotiques testés pour chaque type bactérien.

Tableau 11 : les antibiotiques testés pour quelques espèces des bacilles à Gram négatifs

Entérobactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
Ampicilline (10µg),	Ticarcilline (75µg)	, Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg),	Ampicilline (10µg)
Céfotaxime (30µg)	Ticarcilline + acide clavulanique (75/10µg),	Aztréonam (30µg)	Doxycycline 30 µg
Céftazidime	, Aztréonam (30µg)	Gentamicine (10µg)	Amoxicilline + Acide clavulanique (20/10µg)
Gentamicine (10µg),	Gentamicine (10µg)	Tobramycine (10µg)	Chloramphénicol
Amoxicilline + Acide clavulanique (20/10µg),	Ticarcilline (75µg)	Lévofloxacine (5µg)	Pénicilline 10 µg
Chloramphénicol (30µg)	Tobramycine (10µg)	Fosfomycine (50µg)	Ceftriaxone 30 µg
Fosfomycine (200µg),	Lévofloxacine (5µg)	Rifampicine (30µg)	Erythromycine 15 µg
Céfoxitine (30µg),	Fosfomycine (50µg)	Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)	Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg)
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole (1.25/23.75µg),	Rifampicine (30µg)		

▪ 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 Pétri fermée.
- Pour les bactéries testées sur Mueller-Hinton au sang, les mesures de diamètres de zones d'inhibition seront prises, boîte de Pétri ouverte et bien éclairée.
- Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes dans le fascicule de la **standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (6^{ème} édition 2011)**.

▪ NB : outils statistiques

Le test khi 2 (χ^2) a été employé pour comparer les fréquences de résistances des souches isolées aux antibiotiques chez les malades hospitalisés à celles obtenues chez les malades consultants. L'intervalle de confiance a été de 95% avec un degré de liberté de un

Principe : (voir les tableaux de contingence dans l'annexe 7).

1. Ranger les valeurs sous forme de tableau : il s'agit de fréquences observées.
2. Calculer la somme des colonnes et des rangées.
3. Calculer les fréquences théoriques : il s'agit du produit de la somme des colonnes par la somme des rangées, respectif, diviser par la somme totale
4. Appliquer la forme $\chi^2 = \sum \frac{(O-T)^2}{T}$
5. Calculer le degré de liberté : ddl
ddl= L-1 (L le nombre des échantillons)
6. Comparer le χ^2 calculé au χ^2 de table
7. Conclusion :
 - Si le χ^2 calculé est supérieur au χ^2 de la table : il existe une différence significative entre les fréquences de résistance aux antibiotiques observés chez les souches hospitalières et les souches communautaires.
 - Si le χ^2 calculé est inférieur au χ^2 de la table : il n'existe pas une différence significative entre les fréquences de résistance aux antibiotiques observés chez les souches hospitalières et les souches communautaires.

I. Analyse microbiologique des échantillons:**1. Répartition des prélèvements après culture : (figure 2)**

Sur les 1701 prélèvements analysés, 9,7% (165) étaient de culture positive, 83,72% (1424) étaient de culture négative, 6,58% (112) étaient des prélèvements contaminés.

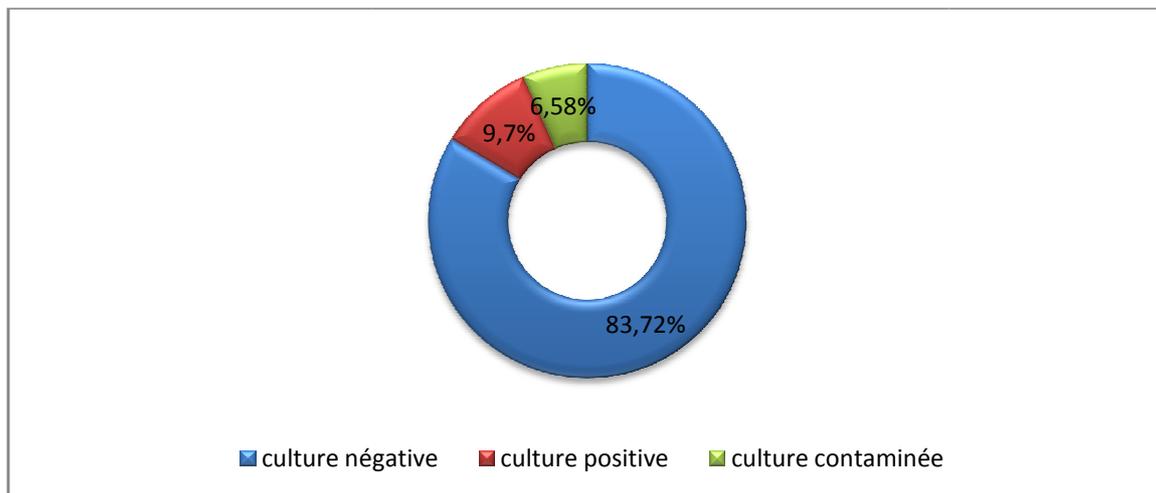


Figure 2: Répartition des prélèvements après culture

Les résultats montrent un pourcentage élevé des cultures négatives ceci peut être due à une mauvaise orientation médicale. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs : l'infection peut être virale ne nécessite pas une analyse bactériologique, L'infection peut être due à des germes anaérobies où le diagnostic nécessite des milieux et des conditions d'incubation spécifiques.

Aussi la prise préalable d'antibiotique peut décapiter l'infection et donner une culture négative.

2. La fréquence des souches isolées :(Figure 3)

Le nombre de souches isolées sur les 165 prélèvements positifs était de 177. 27,12% (48) étaient des cocci à Gram positif et 72,88% (129) étaient des bacilles à Gram négatif représentant. Sur les 129 bacilles à Gram négatif 116 étaient des entérobactéries (89,92%) et 13 étaient des bacilles à Gram négatif non fermentaires (10,08%).

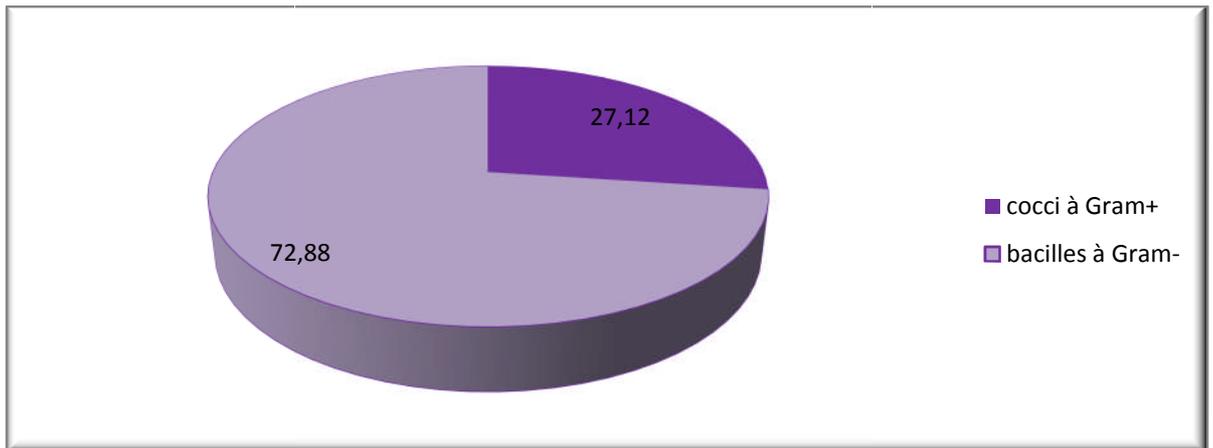


Figure 3: répartition des souches isolées

Les Entérobactéries sont les principales espèces bactériennes isolées ceci peut être expliqué par la nature fécale et urinaire des prélèvements.

3. La répartition des bacilles à Gram négatif isolés (figure 4) :

Escherichia coli est l'espèce la plus isolée. Elle représente 66,67% (86 souches) de l'ensemble des isolats, suivie par *Klebsiella spp* 15,50% (dont 16 souches de *Klebsiella pneumoniae* et 4 souches de *Klebsiella oxytoca*), *Pseudomonas aeruginosa* (6,98%), *Proteus mirabilis* (3,88%), *Enterobacter spp* (3,1%), *Acinetobacter baumannii* (2,33%), *Proteus vulgaris* (0,77%) et *Pasteurella multicauda* (0,77%).

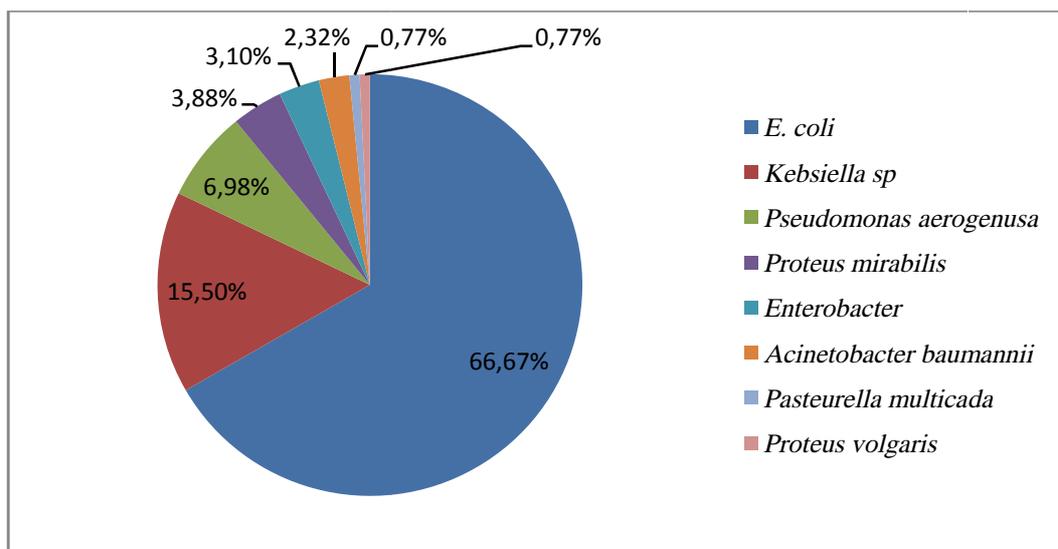


Figure 4: la distribution des bacilles à Gram négatif isolés

4. Répartition des BGN isolés en fonction des prélèvements :

Dans le tableau qui suit, nous présentons les différentes bactéries isolées en fonction de la nature du prélèvement (urine, pus, sang, liquide pleural, pertes vaginales).

Tableau 12: la distribution des souches selon les prélèvements

Prélèvement bactéries	urine	pus	sang	Liquide pleural	Pertes vaginales	Total
<i>E. coli</i>	77	8	1	0	0	86
<i>Klebsiella spp</i>	14	5	1	0	0	20
<i>Enterobacter</i>	3	0	0	1	0	4
<i>Proteus mirabilis</i>	2	3	0	0	0	5
<i>Proteus vulgaris</i>	0	1	0	0	0	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	8	0	0	0	9
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	3	0	0	0	3
<i>Pasteurella multocoda</i>	0	1	0	0	0	1
Nombre total des bactéries	97	29	2	1	0	129

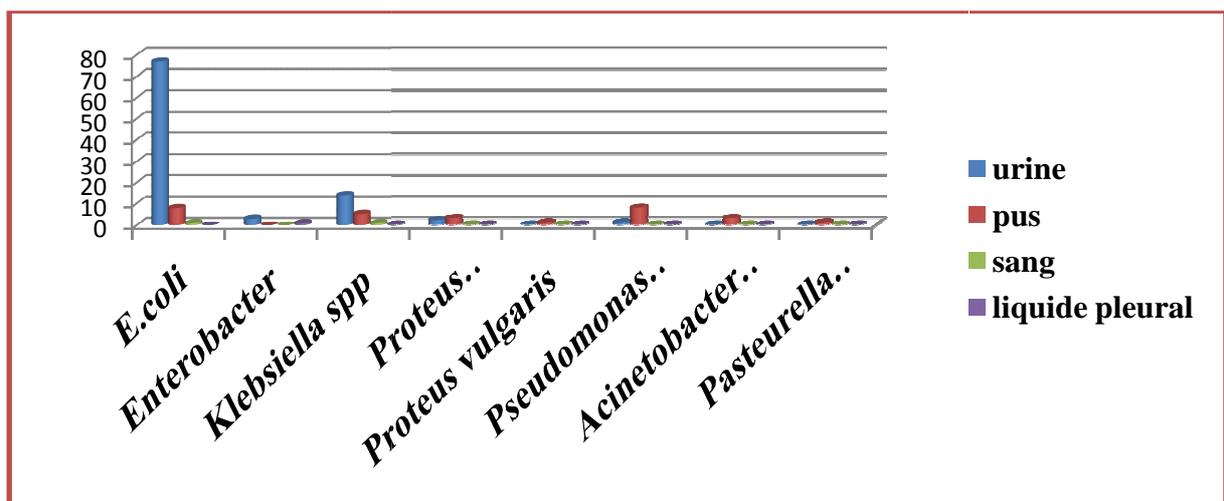


Figure 5 : La répartition des souches en fonction des prélèvements

5. Répartition des souches selon les services

Tableau 13: la répartition des isolats selon les services :

La famille	service	chirurgie	réanimation	Néphron	Pédiatrie	Maladie interne	Maladie infectieuse	externe
	bactéries							
<i>Entérobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	2	1	3	1	4	1	74
	<i>Klebsiella spp</i>	4	0	1	0	1	0	14
	<i>Enterobacter</i>	1	1	0	0	0	0	2
	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	1	0	3
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Les bacilles à Gram négatif non fermentaires</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	1	0	0	0	0	3
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	0	0	0	0	1	0
	<i>Pasteurella multocoda</i>	0	0	0	0	0	1	0
	Total	16	3	4	1	6	3	96

L'analyse de nos résultats montre qu'*E. coli* est la principale bactérie isolée 66,67% (86 /129). Ces résultats concordent avec les taux d'isolement rapportés dans la littérature, selon **PILLY (2006)** *Escherichia coli* serait responsable de 60 -80% des infections urinaires. Elle est aussi la bactérie la plus isolée en milieu hospitalier 36,36% (12/33) ; l'étude de **Tagajdid et al en 2008** a rapporté un pourcentage de 35,6%. Dans notre étude le *Pseudomonas aeruginosa* était impliqué dans 18,48% (6/33) des infections nosocomiales et arrivait en deuxième position après *E. coli*, l'étude de **Minchella et al en 2009** rapporté un pourcentage de 10,08%. Un cas de *Pasteurella multocoda* a été isolé chez un patient mordu par un chat.

6. Répartition des prélèvements selon le sexe :

Sur les 117 prélèvements positifs à bacilles Gram négatif : 73 prélèvements provenaient de femmes et 44 prélèvements provenaient des hommes.

- ❖ Les cinq prélèvements de sang et un prélèvement de liquide pleural de culture positive provenaient de femmes hospitalisées.
- ❖ La répartition des infections urinaires selon le sexe :(figure 5)

Sur les 95 cas positifs, 65 prélèvements provenaient de femmes avec une fréquence de 68,42% et 30 prélèvements provenaient d'hommes avec une fréquence de 31,58%.

Le sexe ratio F/H : 2,17

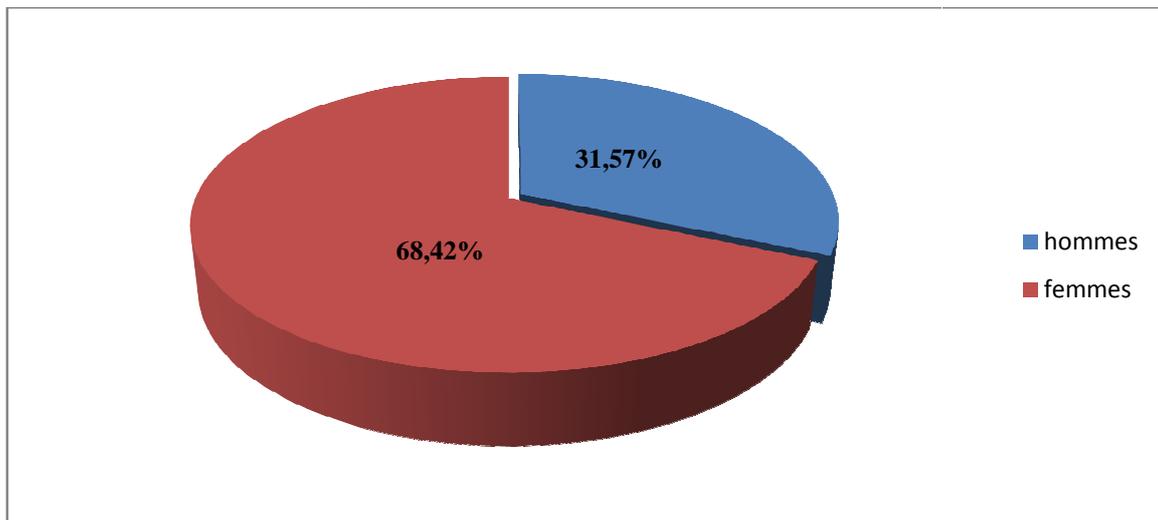


Figure 6: la répartition des infections urinaires selon le sexe

Cette différence remarquable nous emmenés à faire un test d'indépendance qui nous permet de savoir si les infections urinaires ont une relation avec le sexe du patient.

Tableau de contingence (test d'indépendance)

	Absence d'infection urinaire Observer/calculer	Présence d'infection urinaire Observer/calculer	Total
Hommes	478/473,45	30/34,54	508
Femmes	824/828,54	65/60,45	889
Total	1302	95	1397

- ❖ On pose l'hypothèse nulle H_0 : il y a une indépendance entre l'infection urinaire et le sexe de la personne.
- ❖ Pour que l'hypothèse H_0 soit confirmée il faut que χ^2 calculé soit systématiquement inférieur au χ^2 de table
- ❖ Calcule de χ^2 :

$$\chi^2 = [(478-473,45)^2/473,45] + [(30-34,54)^2/34,54] + [(824-828,54)^2/828,54] + [(65-60,45)^2/60,45]$$

$$\chi^2_{\text{calculé}} = 1 < \chi^2_{5\%}(\text{ddl}=1) = 3,84$$

H_0 est retenue : il y a aucune relation entre le sexe et les infections urinaires.

L'étude statistique révèle n'aucune relation entre le sexe et l'infection urinaire, dans la littérature (LECOMOTE 2000) et (E. PILLY.2003) la fréquence des infections urinaires chez la femme justifiée par l'anatomie périnéale de la femme: périnée court, voies génitales proches du méat urinaire et urètre court et large.

❖ la répartition des prélèvements de pus selon le sexe (figure 6) :

Sur les 17 cas positifs, 12 prélèvements provenaient des hommes avec une fréquence de 82,35% et 5 prélèvements provenaient des femmes avec une fréquence de 17,64%

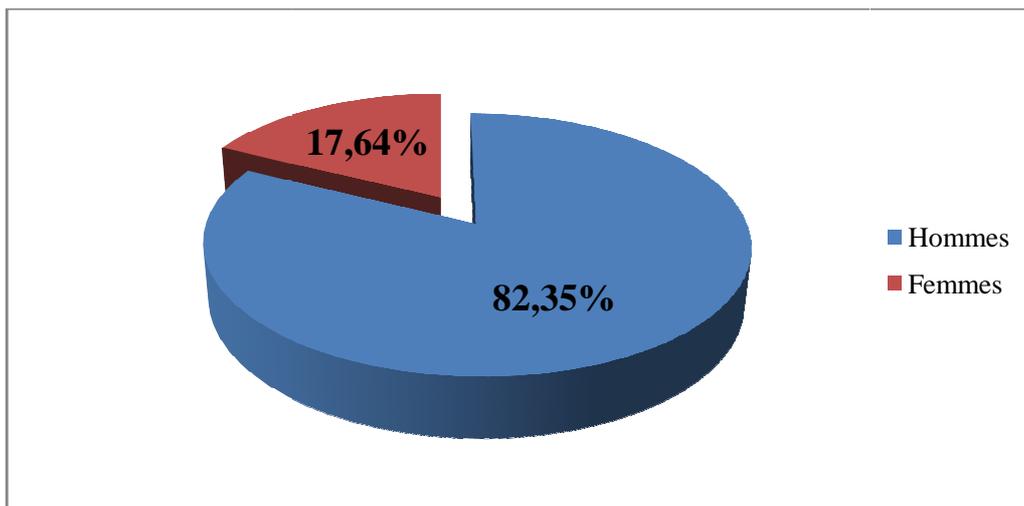


Figure7:la répartition des prélèvements de pus selon le sexe

La fréquence des infections de plaies chez l'homme peut être fortuite, mais cette fréquence peut être liée au travail difficile et manque d'hygiène chez les hommes..

II. Le profil de sensibilité aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif isolées *E. coli* : sur les 86 isolats ; nous avons compté 12 souches hospitalières et 74 souches communautaires. Le profil de sensibilité aux antibiotiques des deux groupes de bactéries est représenté dans le tableau 14

Tableau 14: Pourcentage de résistance aux antibiotiques des souches d' *E coli*

Antibiotiques testés	Les souches communautaires N= 74	Les souches hospitalières N=12	Global N=86
Ampicilline	85,91%	100%	87,95%
céfazoline	51%	83,33%	59,18%
céfixime	9,52%	57,14%	17,39%
Céfotaxime	17,56%	46,15%	21,84%
Gentamicine	21,87%	20%	21,62%
Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	45,16%	77,78%	49,29%
Chloramphénicol	12,5%	80%	28,57%
Acide nalidixique	36%	83%	44%
Fosfomycine	4,84%	20%	6,94%

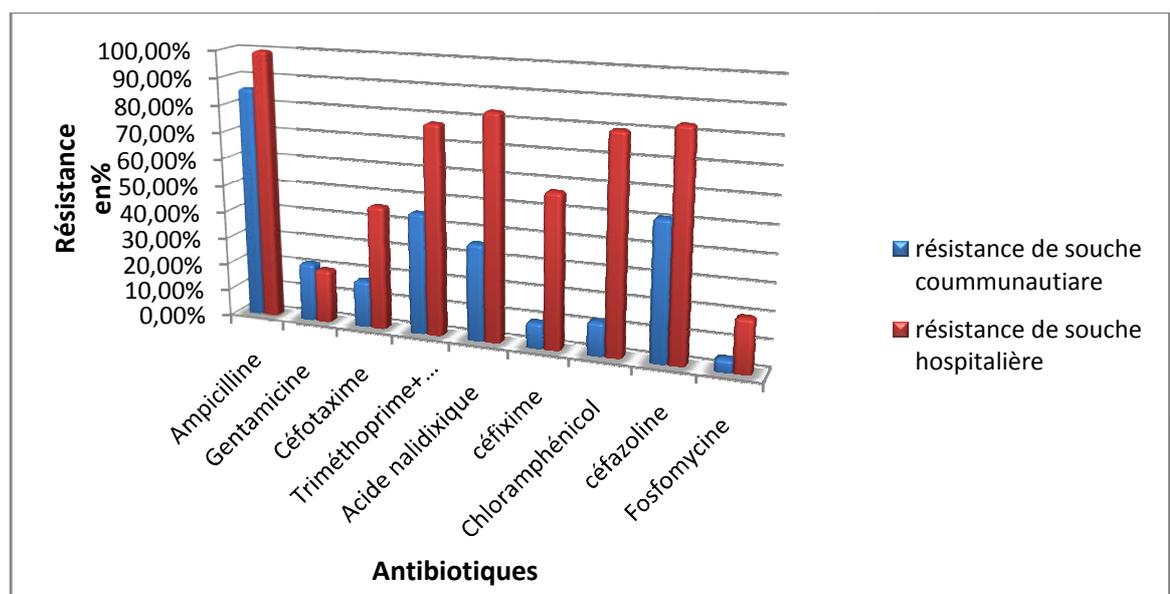


Figure 7: Pourcentage de résistance des souches *Escherichia coli*

Plus de 80% de nos souches *d'E. coli* sont résistantes à l'ampicilline, des taux voisins sont rapportés par **Hamouche, 2011** (76,2%).

La résistance aux céfotaxime est de 21,84% plus élevée que celle rapporté dans l'étude tunisienne (**Mkaouar et al., 2008**) (15%). Ceci peut être expliqué par le recours fréquent en milieu hospitalier à cet antibiotique.

Le triméthoprime+ sulfaméthoxazole et les quinolones (NA) sont des molécules de choix dans le traitement des infections urinaires, la large prescription de ces molécules a été suivie d'une forte résistance, dans notre série près de la moitié des souches *d'E. coli* est résistante aux triméthoprime+ sulfaméthoxazole et quinolones.

La différence entre les fréquences de résistance dans les deux groupes (hospitalières et communautaire) était statistiquement significative dans le cas de céfixime, sulfaméthoxazole + triméthoprime et acide nalidixique. Cependant, il n'a pas été montré de différence statistiquement significative entre le taux de résistance aux céfotaxime, gentamicine, chloramphénicol et fosfomycine observé chez les deux groupes.

Klebsiella spp :

Sur les 20 souches de *Klebsiella* isolées 6souches étaient hospitalières et14souches étaient communautaires.

Tableau 15: Pourcentage de résistance des souches *Klebsiella* isolées.

Antibiotiques testés	Les souches communautaires	Les souches hospitalières	Globale
Ampicilline	92,30%	85,71%	90%
céfazoline	20%	71,42%	41,18%
céfixime	12,5%	75%	33,33%
Céfotaxime	23,07%	57,14%	35%
Gentamicine	8,33%	57,14%	26,32%
Triméthoprime+ sulfaméthoxazole	30,76%	57,14%	40%
Acide nalidixique	18,18%	42,86%	27,77%
Fosfomycine	7,69%	33,33%	15,79%
Norfloxacin	14,28%	66,67%	30%

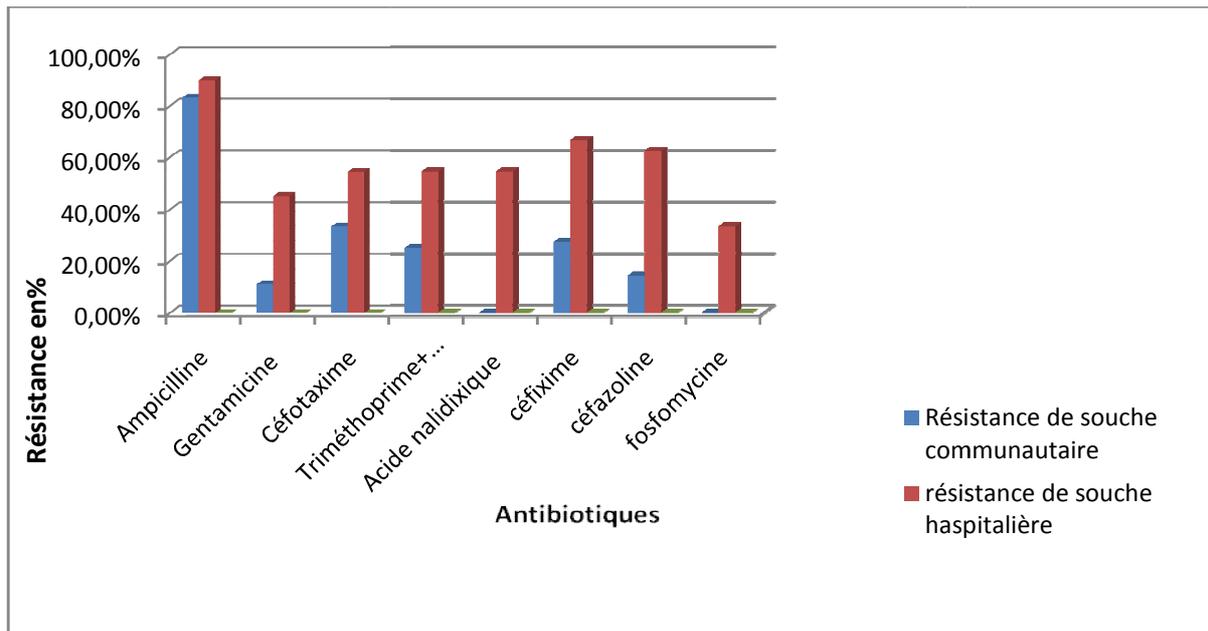


Figure 9: pourcentage de résistance des souches *Klebsiella spp* isolées

Les taux de résistance de nos souches de *Klebsiella spp* aux antibiotiques sont proches de ceux rapporté dans l'étude **Ben hadj en 2010**, seulement pour la céfotaxime la résistance de nos souches dépasse les 34%, elle est de 22% dans l'étude tunisienne. Pour la même raison que pour les souches d'*E. coli*, la céfotaxime est largement prescrit dans notre établissement menant à une résistance fréquente des souches isolées.

La différence entre les fréquences de résistance dans les deux groupes (hospitalières et communautaire) était statistiquement significative dans le cas de céfixime, gentamicine, norfloxacin et céfazoline. Cependant, il n'a pas été montré de différence statistiquement significative entre le taux de résistance aux céfotaxime, triméthoprim + sulfaméthoxazole, acide nalidixique, et fosfomycine observé chez les deux groupes.

Proteus mirabilis :

Toutes les souches de *Proteus mirabilis* isolées étaient d'origine hospitalière, aucune résistance n'a été notée pour la Gentamicine, Céfotaxime, Ofloxacine et la Fosfomycine. La résistance de ces souches pour l'ampicilline, triméthoprim+ sulfaméthoxazole, acide nalidixique et chloramphénicol est respectivement de 66,67%, 66,67% ; 66,67%, 50%.

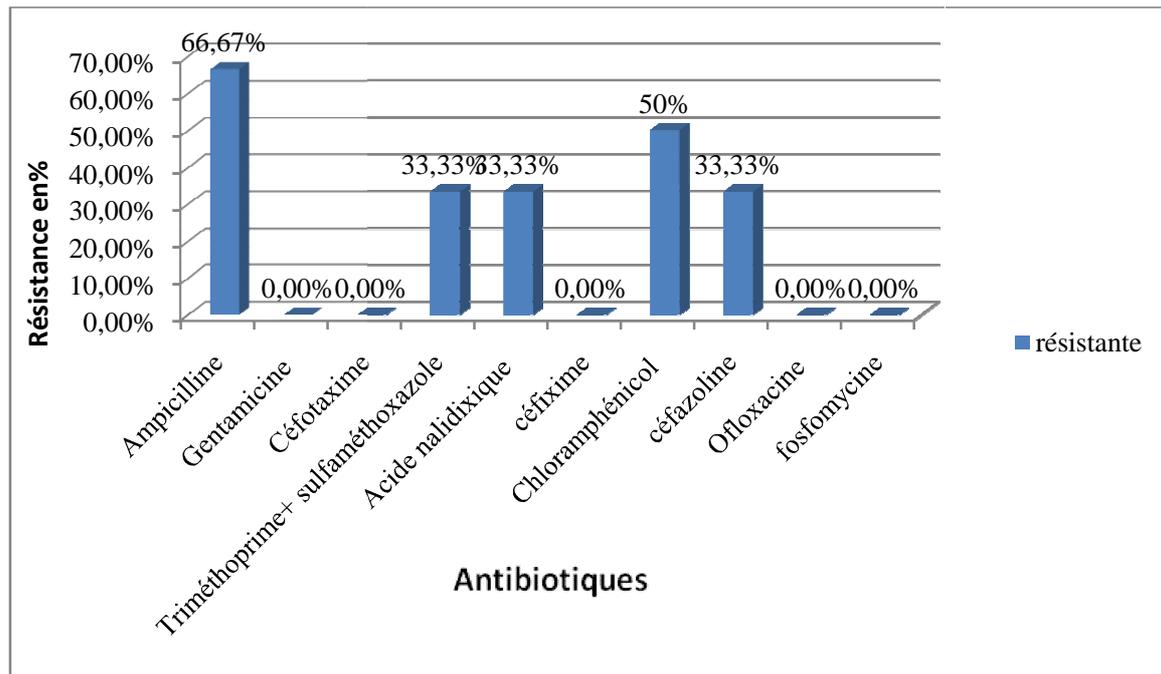


Figure 10: pourcentage de résistance des souches de *Proteus mirabilis* isolées

Enterobacter spp :

Dans notre série nous avons isolé quatre souches d'*Enterobacter spp*, (deux souches hospitalières et deux souches communautaires). Les souches hospitalières affichaient des taux de résistances naturellement plus élevés que les souches communautaires, a voisinent les 100% pour certains molécules notamment l'ampicilline, la céfotaxime, la gentamicine, l'acide nalidixique, la céfazoline. (Figure 11)

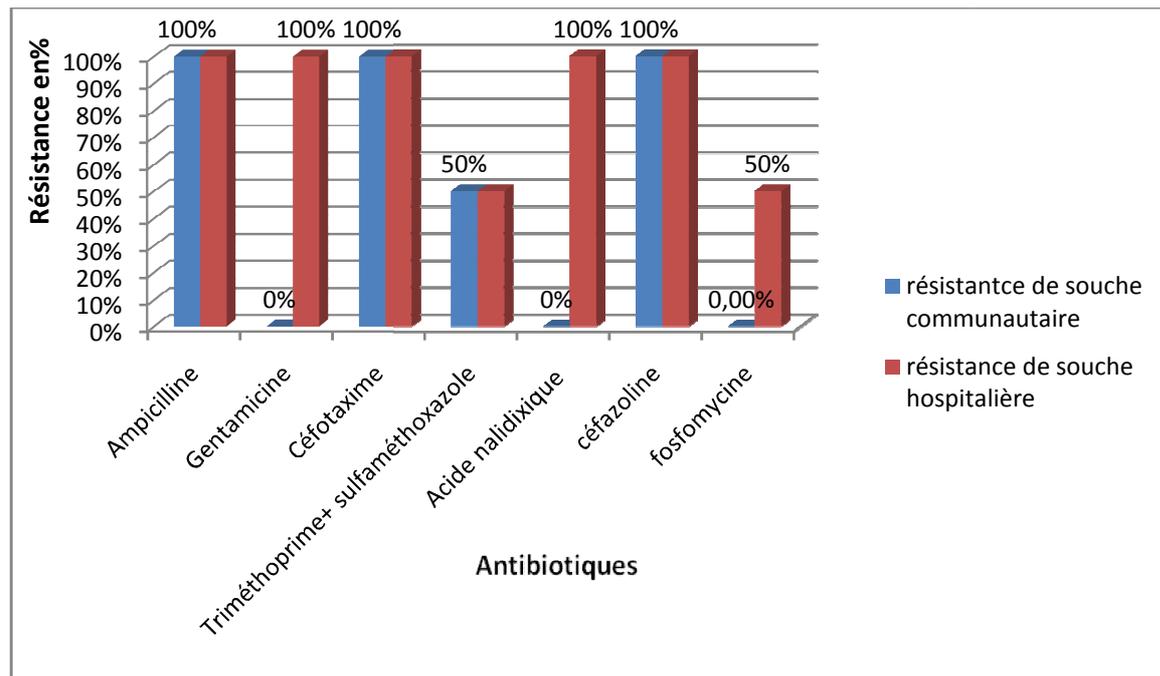


Figure10 : Pourcentage de résistance des souches des *Enterobacter spp* isolées

Les deux souches hospitalières ont été isolées dans les services de réanimation et de la chirurgie où l'utilisation abusive des molécules à large spectre exerce une pression de selecte des souches multirésistantes. D'après les chercheurs ; *Enterobacter spp* est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et peut être à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que d'infections cutanées. Il peut également être responsable de bactériémies, et c'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années (**Anonyme 2013**). La communié médical américaine a récemment décrite la guerre contre les *Enterobacter spp* en raison d'évolution de leur résistante vis-à-vis les antibiotiques dans les milieux hospitalières (**Boyer et al., 2011**).

L'étude statistique n'a montré aucune différence significative entre les fréquences de résistance des souches hospitalières et souches communautaires aux antibiotiques.

Pseudomonas aeruginosa :

9 souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées ; 6 souches hospitalières et 3 souches communautaires.

Les souches hospitalières isolées étaient résistantes à la rifampicine et plus en moins sensibles aux bêta lactamines et aminosides testés.

Les souches communautaires étaient 100% sensibles vis-à-vis aztréonam tobramycine ; 66.67% sensibles vis-à-vis Ticarcilline+ ac clavulanique, céftazidime, Pipéracilline et 100% résistantes vis-à-vis la rifampicine

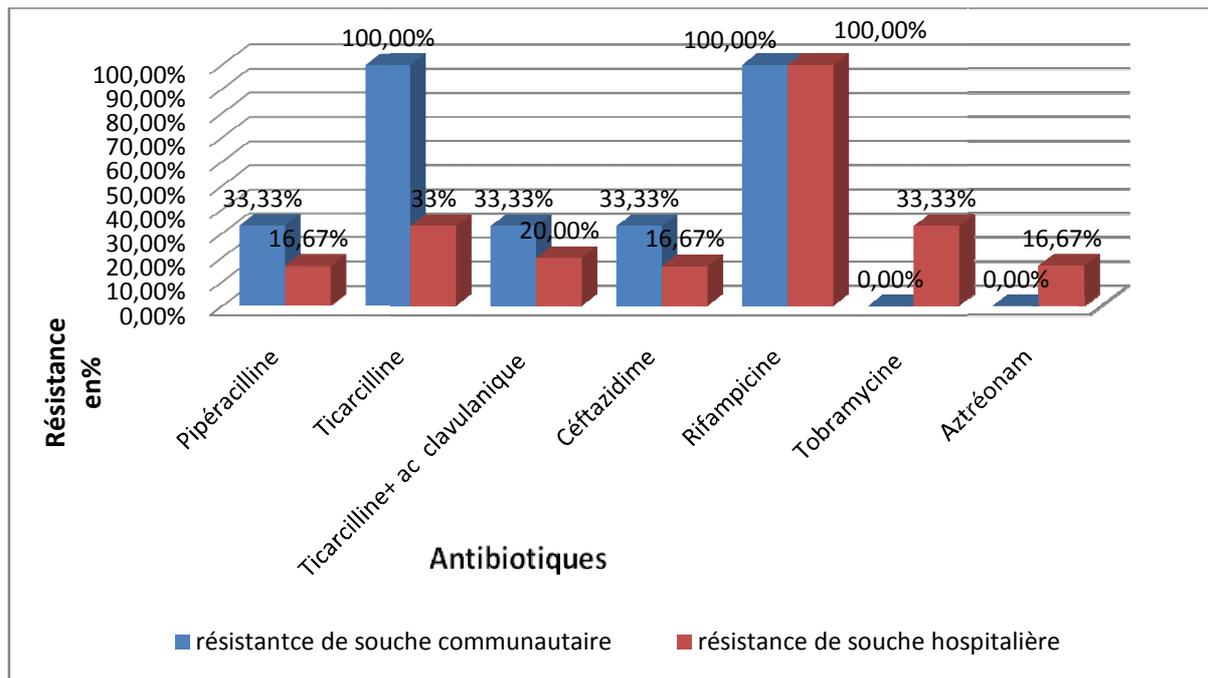


Figure12: Pourcentage de résistance des souches des *Pseudomonas aeruginosa* isolées

Au cours la période d'étude la majorité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* provenaient des services de chirurgie avec un pourcentage 31,25% selon **Rio et al 2003**, *Pseudomonas aeruginosa* est un germe hospitalier par excellence. Les taux de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques sont moins importante que celles rapportés dans la littérature notamment dans l'étude française (**Minchella et al., 2009**). En effet l'épidémiologie de la résistance est variable d'un pays a l'autre voire d'établissement à un autre.

L'étude statistique n'a montré aucune différence significative entre les fréquences de résistance des souches hospitalières et souches communautaires aux antibiotiques.

Acinetobacter baumannii :

Les 3 souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées étaient des bactéries hospitalières multirésistantes. Toutes résistantes à la pipéracilline, ticarcilline, ticarcilline + acide clavulanique, céftazidime, Triméthoprime+ sulfaméthoxazole, acide nalidixique. Elles sont moins résistantes pour tobramycine (66,67%) la gentamicine (66,67%) et rifampicine (50%).

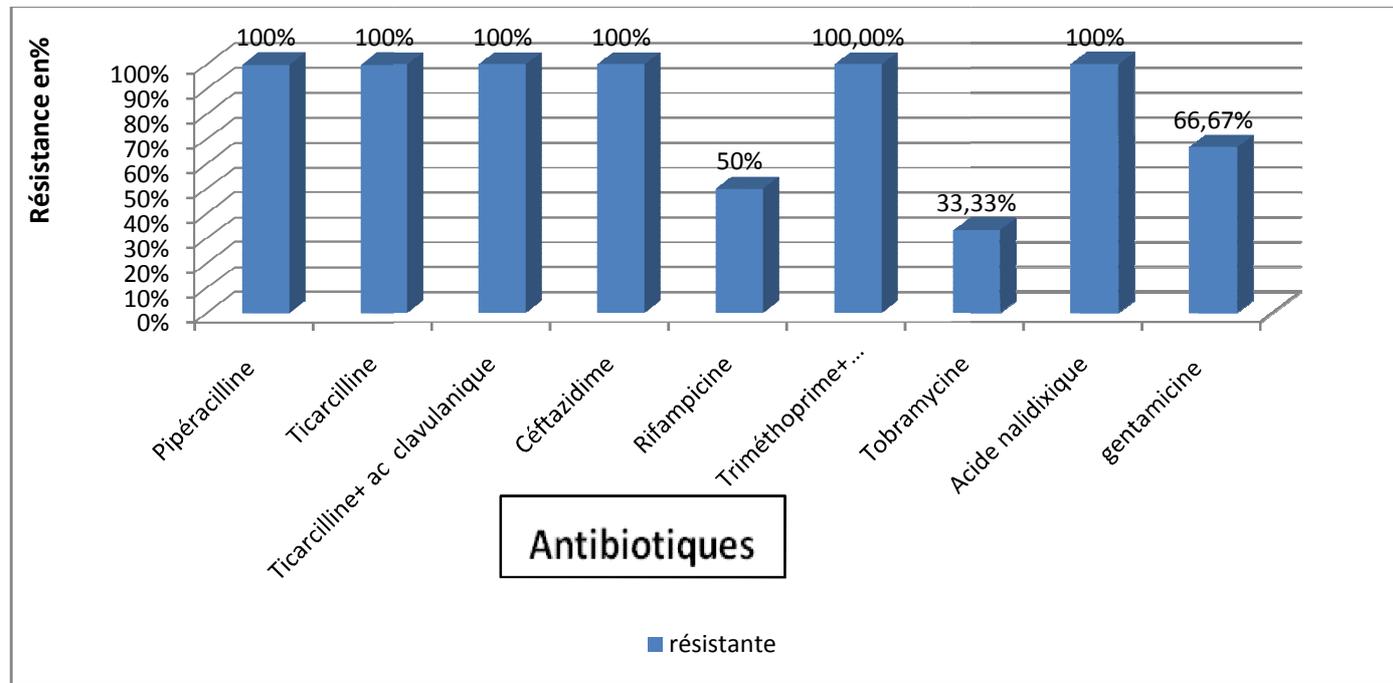


Figure 13: Pourcentage de résistance des souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées

Depuis quelques années, ce germe est considéré comme un pathogène opportuniste responsable d'un taux croissant d'infections nosocomiales sévères (Lahsoune *et al.*, 2007) La capacité de survie dans des conditions rudimentaires, la résistance naturelle et la grande diversité des plasmides confèrent à la bactérie un grand potentiel d'acquisition des résistances, par ailleurs, l'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre sélectionne les souches multirésistantes(Chastre, 2003). Pour ces raisons dans notre étude les souches isolées sont résistante vis-à-vis la majorité des antibiotiques testés.

Conclusion

Durant notre étude au laboratoire d'analyse médicale d'EPH Fares Yahia 1701 prélèvements pathologiques issus des différents prélèvements urinaires, vaginales, de pus, de sang et des liquides de ponction.

A partir de prélèvements, nous avons isolés 129 bacilles à Gram négatif. Sur la base de l'identification biochimique et physiologique. Nous les avons séparés en deux groupes les Entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires.

Les Entérobactéries représentent les bactéries les plus fréquemment isolés avec un taux de 89,92% alors que les bacilles à Gram négatif ne représentent que 10,08%.

Les Entérobactéries sont des saprophytes du tube digestif. Il constitue un réservoir d'une taille très importante susceptible de disséminer autour de chaque patient et de contaminer son environnement.

Leur diffusion est donc très liée au péril fécal mais peut être contrée par des mesures associant la précaution standard (hygiène des mains, tenue de protection, port de gants, gestion du matériel et des surfaces souillées, circuit du linge, des déchets et des prélèvements biologiques ...), la détection précoce des porteurs des bactéries multirésistantes.

Pour les 129 souches isolées nous avons déterminé in vitro la sensibilité aux antibiotiques par technique de diffusion en milieu gélosé (antibiogramme). Ce test a révélé des taux de résistance élevés pour certains antibiotiques, plusieurs facteurs est en cause :

- La prescription inadéquate des antibiotiques dans le cas des infections virales.
- Le choix des antibiotiques porté sur leur disponibilité et non pas selon recommandation thérapeutiques.
- L'automédication des antibiotiques par le patient sans avis médicale.
- Le non respect des délais impératifs à la consommation des antibiotiques.
- Le choix de l'antibiotique est parfois conditionné par son prix et non par ses indications thérapeutiques.

Ainsi au final de ce travail, nous concluons qu'avant tout antibiothérapie, il convient de réaliser une étude bactériologique des prélèvements, d'évaluer la sensibilité aux antibiotiques des germes isolés, d'adapter le choix thérapeutique en fonction des résultats d'antibiogramme. Il faut aussi respect les règles d'hygiène surtout au niveau de services de l'hôpital.

Aussi l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de différentes bactéries isolées permet de préciser les éléments thérapeutiques probabilistes dans notre établissement

- **Abbott SL., O’connor J., Robin T., Zimmer BL., and Jand J.M., 2003:** Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species 4852-4854.
- **Andre MH., Lortholary O et Bryskier A.,1998 :** Classification des antibiotiques : relation structure-activité. *Encycl Méd Chir* (Elsevier, Paris), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, 5-0015, 6 p.
- **Archambaud M., Clave D., 2004 :** fiche Technique : *Proteus mirabilis*. Laboratoire de bactériologie Hygiène CHU Toulouse Rangueil.
- **Auckenthaler R., 1995 :** Activité antibactérienne. Spectre. Mode d’action. Cibles bactériennes. In : *Antibiothérapie en pratique clinique*. BERGOGNE-BEREZIN E., DELLAMONICA P. Masson, P17-32 .
- **Avril (J-L)., Dabernat H., Demis F et Monteil H ., 1992 :** *Bactériologie Clinique* édition : Ellipses, paris.
- **Avril (J-L)., Fauchere (J-I).,2002 :** *Bactériologie médicale et clinique*. Paris Ellipses 175p.
- **Avril J.L., Dabernat H., Denis F, Monteil H.2000 :** *Bactériologie clinique* 3éme édition ellipse.
- **Baba Ahmed-Kazi Z., Arlet G., 2014 :** Actualité’ de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie* (Paris).
- **Ben Haj Khalifa A., Khedher M., 2010 :** Epidémiologie des souches de *Klebsiella spp* uropathogène productrice de béta lactamases à spectre élargie dans un hôpital universitaire tunisien 2009. *Pathologie Biologie* 60 (2012) e1–e5 Edition Elsevier Masson SAS.
- **Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B., 2004 :** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie*. 6 (53): 341-348.
- **Bidet p et Bingen E :** Bacilles à Gram négative aéro-anaérobies In *Bactériologie médicale Techniques usuelles*, édition Elsevier Masson. p297
- **Boyer A., Clouzeau B., Mzalif., Hilbert G., Gruson D., 2011:** Les nouvelles résistances aux antibiotiques. *JARCA* 19p.
- **Brysqwier A. 1999 :** Fluoroquinolones (II).Usage en thérapeutique et tolérance. *Encycl Méd Chir, Maladies infectieuses*, 8-004-B-11,:14 p.
- **Brysqwier A., 1999 :** *Antibiotiques, Agents antibactériens et Antifongiques*. Paris Ellipses P158-563

- **Carbonelle B., Denis F., Marmonier A., Pinons G., Vargues R., 1990 :** Bactériologie médicale techniques usuelles. Paris Simep p : 76-330.
- **CATTOIR V., 2006 :** Chloramphénicol, fosfomycine, acide fusidique et polymixines. In : ANTIBIOGRAMME ; Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. 2ème édition, P 349-364.
- **Chastre J., 2003:** infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU sem. Respircrit care Med 2003, 24-69-77.
- **Courvalin P., Leclercq R et Bingen E., 2012 :** AntibioGramme 3^{ème} édition paris 795p.
- **Dellaras C., 2007 :** Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. paris Lavoisier p : 248-357.
- **Denis F., ploy M-C., Martin C., Bingen E., Quentin R.2007:** Bactériologie médicale Techniques usuelles, édition Elsevier Masson p-295-352. 572p
- **Dominique D.,2012 :** *Acinetobacter baumannii* et résistance aux antibiotiques : un modèle d'adaptation. Revue francophone des laboratoires - avril 2012 - n° 441 //. Edition Masson Elsevier.
- **Dortet L., Legrand P., Soussy C-J., Cattoir V., 2006 :** Bacterial identification, clinical significance, and antimicrobial susceptibilities of *Acinetobacter ursingii* and *Acinetobacter schindleri*, two frequently misidentified opportunistic pathogens. J Clin Microbiol. 44(12): 4471–4478.
- **Felissa R., Lashley., Jerry D., Durham., Aylward RB., 2007:** Emerging infectious diseases. 2^{ème} édition New Yourk. Springer publishing Company.
- **Francois.J., Chomarat M., Weber M., Gerard, 2003 :** a de l'antibiogramme à la prescription. Biomerieux, 2ème édition. p8-p22.
- **Frenay J., Renaud, Hansen W., Ballet C.,2007 :** précis de Bactériologie clinique. ESKA.1685p.
- **Grappin M, Chavanet P., Portier H.,1998.** Bêtalactamines. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Encyclopédie Pratique de Médecine, 5-0020, 1998, 7 p
- **Hamouche E., Sarkis D.K.,2011 :** Evolution de la sensibilité aux antibiotiques d'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009, Pathologie Biologie 60 (2012) e15–e20.
- **Husson M O., Harf C., Montiel H., 2007 :** *Pseudomonadaceae* . P 1132 In précis de bactériologie clinique.

- **Jaly B., Renaud A., 2003** : *Entérobactéries*: systématique et méthodes de diagnostic paris Lavoisier. 356p. p3
- **Jean M., 2004.** Evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme. Atelier Santé Environnement. ENSP. P: 5-6.
- **Khalilzadeh Pouneh., 2009.** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat. P: 40.
- **Lahsoune M, Boutayeb H, Zerouali K, Belabbes H, EL Mdaghri N.2007** : prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* dans un CHU marocain, Médecine et maladies infectieuses 37 (2007) 828–831. Edition Elsevier Masson SAS.
- **Lambert, 2012** : Aminosides et bactéries à Gram négatif. In antibiogramme; Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. 3ème édition p261-276.
- **Laure M et Hidri N., 2004** : *Acinetobacter* : Maîtrise des infections nosocomiales de A à Z. Editions HEALTH, Paris.
- **Le Minor L-j., VERON M., 1990** : Bactériologie médicale 2^{ème} édition Flammarion p271-729.
- **Lecomte F., 1999** : Infections urinaires. Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, 4-0880, 4 p.
- **Lie S., Kourah A F., 2002** : Sensibilité et révolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du Point G. Thèse de doctorat. P 15.
- **Martin C., 2007** : Bacilles à Gram négatif non fermentaires In bactériologie Médicale Technique usuelles. Denis F, ploy M-C Martin C, Bingen E, Quentin R p 330.
- **Mayer A., Derana J et Bernard A., 2004** : cours de microbiologie générale avec problème et exercices corrigés. 2ème édition Dion éditeurs p217. 452p
- **Meyrier A., 2003** : Infections de l'appareil urinaire. Encycl Méd Chir (Editions Elsevier SAS, Paris.), AKOS Encyclopédie Pratique de Médecine, 5-0560, 5 p
- **Michel –Briand Y., 1993** : infection à bacille pyocyanique. Encycl. Mèd chir (Elsevier SAS, Paris) Maladies infectieuse 8-025-B-50 14p.
- **Minchella A., Molinari L., Alonsa S., Bouziges N., Sotto A., Lavigne J.P., 2009** : Evolution de la résistance aux antibiotiques de *P.aeruginosa* dans un centre universitaire entre 2002 et 2006. Pathologie Biologie 2010.58 1-6. Edition Elsevier Masson.

- **Mirabaud M I., 2003 :** *Entérobactéries* à beta-lactamases a spectre élargi en pédiatrie en 1996. Thèse de doctorat P1.
- **Mkaouar D., Mahjoubi F., Mzghani S., Zhazen A., Ktari S., Hammami A.,2008 :** Etude de résistance des Entérobactéries aux céphalosporines de troisième génération dans les hôpitaux de Sfax. *Médecine et maladies infectieuses* 38(2008) 293-298. Edition Elsevier.
- **Monteil H., 2006 :** Bacilles à Gram négatif non fermentaires. Elsevier Masson SAS 19P p1.
- **Muriel C., Monnet D et Freney J., 2007 :** Citrobacter In précis de bactériologie clinique p 1073-1078 Edition ESKA.
- **Nauciel C., Vilde J-L., 2005 :** Bactériologie médical, édition Masson. 259p
- **Pilly E., 2003:** infection urinaire , Edition Montmorency.196.201
- **Pilly F., 2006 :** infection urinaires de l'enfant et de l'adulte, Edition Eureka,
- **Prescott M., Harley, Klein, 2008.** Microbiology 5^{ème} édition de Boeck université. P810-820. 1133p.
- **Rio y., Pina p., Jurin F., Allouch p., Didion J., chardon H., 2002 :** Sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques, isolés chez des malades de soins intensifs français en 1998, phénotype de résistance aux beta lactamines. *Etude Escrime pathologie Biologie* 2002 ,50 :12-7.
- **Rossignol G., 2007 :** Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse de doctorat p7.
- **Tagajdid M.R., Boumhil L ., Iken M., Adnaoui M et Benouda A.,2008 :** Etude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans les urines au fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *Médecine et maladies infectieuses* 40(2010).70-73. Edition Elsevier Masson SAS.
- **Tazia et Poyart C., 2012 :** Tétracycline In Antibiogramme ; Courvalin P, Leclercq R, Bingen E. 3ème édition.
- **Van L M., Goossens H., 2004.:** The ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter spp* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* : 10(8)684-704.
- **Yala D., Meral AS ., Mohamedi D., Ouar korich MN ., 2001 :** n°91 : classification et modes d'action des antibiotiques.

Les adresses des sites d'internet :

WWW.Sciencedirect.com

WWW.emconsult.com

WWW.insv.santé.fr/ralb

WWW.bactériologie.com

- **Anonyme 2002-2003** : Bactériologie, faculté de médecine pierre et marie curie université paris –VI, service bactériologie.
- **Anonyme** : Bactériologie systématique, Faculté de Médecine Necker-Enfants malades, 2002/2003
- **Anonyme** : Journée européenne de sensibilisation au bon usage des antibiotiques.
18 Novembre 2013.
- **Anonyme** : Mammeri Hedi, Mode d'action des antibiotiques MCU-DH Service de bactériologie CHU Amiens.

Annexe 1: Matériel non biologique (équipement, fourniture, verreries)

Equipement	Fourniture	Verreries
<ul style="list-style-type: none"> - Bec bunzen - Microscope photonique - Agitateur - Séchoir - Bain marie - Réfrigérateur 	<ul style="list-style-type: none"> - Bocal - Jarre - Ecouvillon en coton stériles - Disques des antibiotiques - Gants chirurgicaux - Pieds à coulisse - Pince - Poire - Portoirs - Seringues stériles 	<ul style="list-style-type: none"> - Boîtes des pétri - Cellules de Malassez - Lames et lamelles - Tubes à essai stériles - Tubes secs

Annexe 2 : milieux de culture, colorants et réactifs

Milieux de culture et solution de coloration	Tests et réactifs d'identification
Gélose nutritive	Citrate de Simmons
Gélose au sang cuit	Clark et Lubs
Gélose au sang frais	TSI
Hektoen	Urée indole
Chapman	Eau pitonnée
Gélose Muller Hinton	Disques d'oxydase
Gélose Muller Hinton au sang frais	Eau oxygéné
Bleu de méthylène	Kovacs
Violet de Gentiane	NR1 et NR2
Lugol	Poudre du zinc
Fuchsine	VP1 et VP2
Alcool	Galerie API 20 NE

Annexe 3:Caractères d'identification des bacilles à Gram négatif les plus fréquemment rencontrés dans les infections humaines

Genre	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Providencia</i>	<i>Pseudomonas</i>
Caractères										
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Saccharose	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
Gaz	+	+	+	+	+	+	-			
H₂S	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Uréase	-	+	+	+/-	-	-	-	+	+/-	+
Indole	+	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	+	-
LDC	+	+	-	+/-	+	+/-	-	-	-	-
PDA	-	-	-	-	+	-				
ODC	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
ADH	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	+
RM	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
VP	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	-	+/-	-	-	-
Citrate	-	+	+	+	+	+/-	-	-	+	+
Mannitol	+	-	+	+	+	+	+/-	-	-	-
Mobilité	+	-	+	+	+	+	-		+	+
TDA		-	-	-	-	-	+	+	+	-
PDA	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Annexe 5 : L'aspect des colonies de *Pasteurella multocoda*



Photo 1 : *Pasteurella multocoda* sur gélose nutritive



Photo 2 : *Pasteurella multocoda* sur gélose au sang frais



Photo 3 : *Pasteurella multocoda* sur gélose au sang cuit

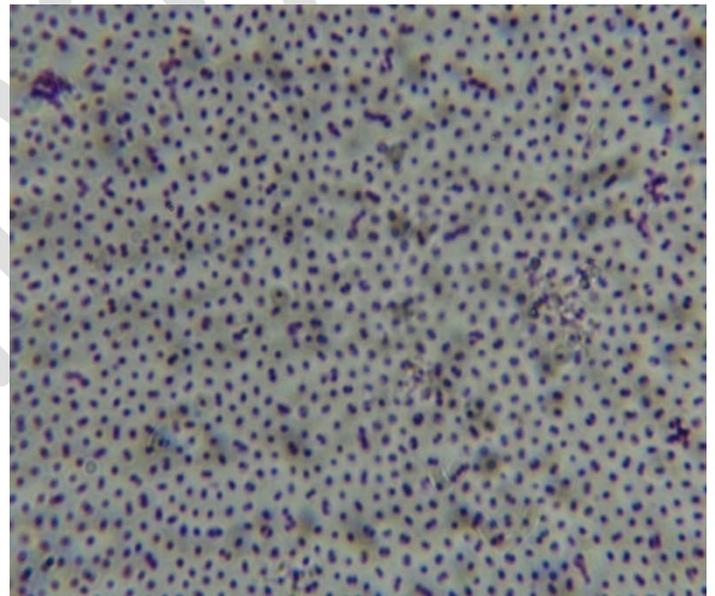
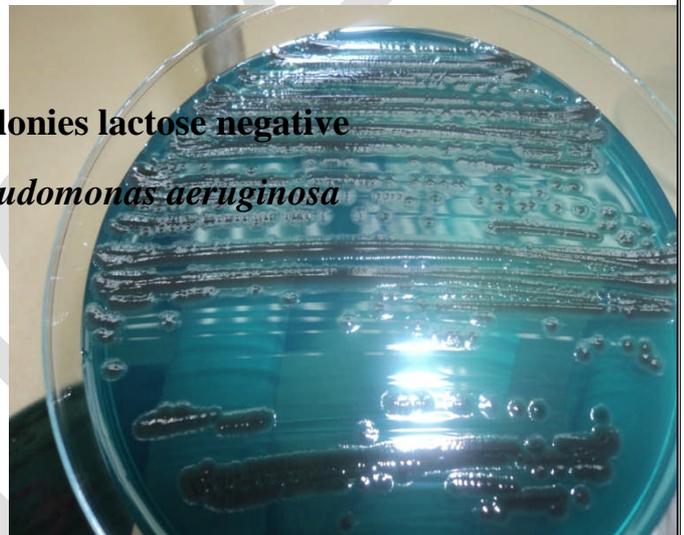
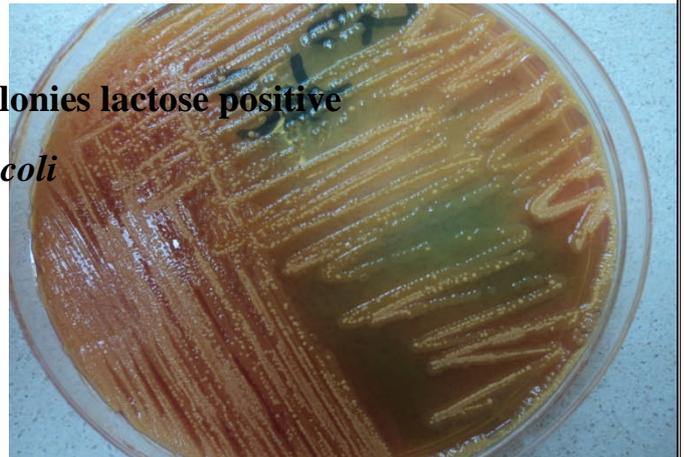


Photo 4 : la coloration de Gram du *Pasteurella*.

Annexe 6 : Composition des milieux de la galerie classique des *Entérobactéries*

Milieu Hektoene

Peptone de viande ou de gélatine	10 g	colonies lactose positive
Extrait de levure	3 g	<i>E. coli</i>
Chlorure de sodium	5 g	
Thiosulfate de sodium	5 g	
Sels biliaires	9 g	
Citrate de fer ammoniacal	1,5 g	
Salicine	2 g	
Lactose	12 g	
Saccharose	12 g	Colonies lactose negative
Fushineacide	0,1 g	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bleu de bromothymol 0,065 g		
Agar (gélose)	14 g	
ED	qsp 1 L	
Le pH :7.5.		



Milieu de CLARKS et LUBS

Formule

- Peptone tryptique 7 g
- Phosphate dipotassique 5 g
- Glucose 5 g
- Eau distillée 1000 ml

Le milieu est ajusté à pH 7 puis VP+

on autoclave à 120°C pendant 20 minutes. VP-



Milieu de recherche des décarboxylases

Formule

Extrait de levure 0,6 g

Glucose 0,2 g

NaCl 1 g

Rouge de phénol 0,03 g

Acide aminé (L arginine, L lysine, L ornithine) 1g **ADH+ LDC+ ODC+**

Eau distillée 100 ml **témoin+**

Le milieu est ajusté à pH 6,3-6,4 et autoclavé à 120°C pendant 15 minutes.

NB : ajouter l'acide aminé à 4 % quand c'est sous

la forme DL.



Eau peptonée

Eau distillée : 1 L

Peptone tryptique : 15 g

NaCl : 5 g

L'eau peptonée doit être exempte d'indole et de sucres fermentescibles et elle doit contenir **Indole+** **Indole-** du tryptophane en quantité suffisante.



Milieu au Citrate de Simmons

Formule

Sulfate de Mg 0,04 g

Phosphate mono ammonique 0,02 g

Phosphate dipotassique 0,2 g

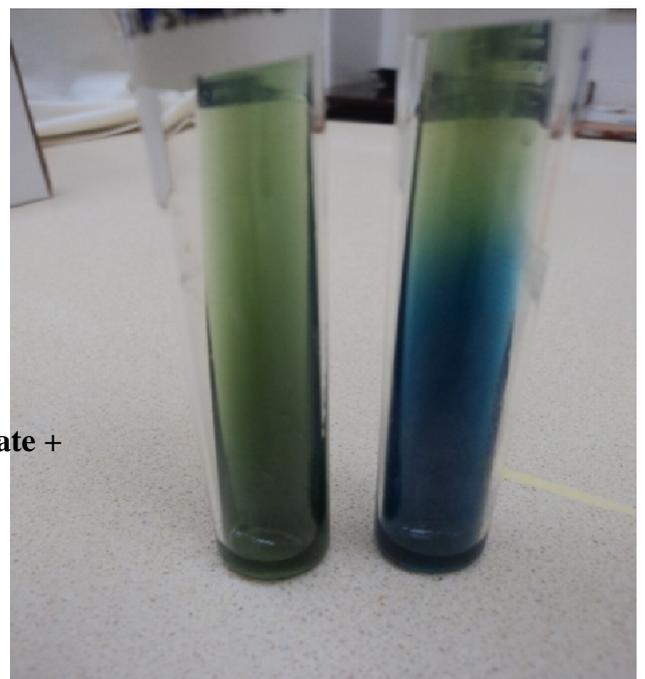
Citrate trisodique 0,4 g

NaCl 1 g

Bleu de bromothymol 0,016 g **Citrate-** **Citrate +**

Eau distillée 100 ml

La dissolution se fait à chaud, le pH est ajusté à 7 et la stérilisation se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.



Le milieu TSI :

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 14,0 g
- Extrait autolytique de levure 3,0 g
- Extrait de viande 3,0 g
- Glucose 1,0 g
- Lactose 10,0 g
- Saccharose 10,0 g **Lactose+**
- Chlorure de sodium 5,0 g **Saccharose + Lactose-**
- Thiosulfate de sodium 0,3 g **Glucose + Saccharose-**
- Citrate ferrique ammoniacal 0,3 g **Glucose-**
- Rouge de phénol 24,0 mg **Gaz+**
- Agar agar bactériologique 13,5 g

pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : $7,4 \pm 0,2$.



Gélose de Mueller Hinton

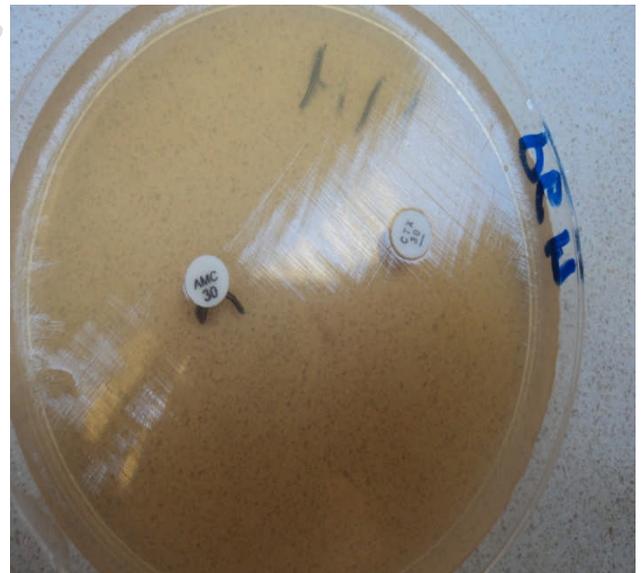
Infusion de viande boeuf : 300 g/L

bio-Case : 17,5 g/L

Amidon : 1,5 g/L

Agar: 17 g/L

pH : 7,3



Toutes les photos sont originales

Annexe7 : le test χ^2

Exemple1 : Comparaison des fréquences de résistance des souches d'*E. coli* hospitalisés et communautaires a la céfotaxime

Hypothèse nulle (H_0) : il n'existe pas une différence entre les fréquences de résistance des souches hospitalisés et des souches communautaires à la céfotaxime.

	Résistante Observé/ théorie	Sensible Observé/ théorie	totale
Souche hospitalisé	5/2,56	7/9,34	$M_1= 12$
Souche communautaire	14/16,34	60/57,65	$M_2= 74$
totale	$N_1=19$	$N_2= 67$	$N= 86$

1. **Calcule les fréquences théoriques :**

$$T_1 = N_1 * M_1 / N$$

$$T_1 = 19 * 12 / 86 = 2,56$$

2. **Après les calculs de toutes les fréquences théoriques on calcule le χ^2**

$$\chi^2 = \sum \frac{(O-T)^2}{T}$$

$$\chi^2 = [(5-2,56)^2 / 2,56] + [(14-16,34)^2 / 16,34] + [(7-9,34)^2 / 9,34] + [(60-57,65)^2 / 57,65]$$

$$\chi^2 = 3,17.$$

3. **Calculer le degré de liberté ddl :**

$$ddl = 2 - 1 = 1. \chi^2 = 3,84$$

4. **Comparaison des χ^2 :**

$$\chi^2 \text{ calculé} = 3,17 < \chi^2 \text{ de table} = 3,84.$$

5. **Conclusion : il n'existe pas une différence significative entre les deux fréquences.**